

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002-543402

(P2002-543402A)

(43)公表日 平成14年12月17日(2002.12.17)

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	テマコード(参考)
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	Z 2 G 0 4 2
C 1 2 Q 1/26		C 1 2 Q 1/26	2 G 0 4 5
G 0 1 N 21/03		G 0 1 N 21/03	Z 2 G 0 5 4
21/27		21/27	Z 2 G 0 5 7
21/33		21/33	2 G 0 5 9
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全108頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000-615064(P2000-615064)
(86) (22)出願日 平成12年5月1日(2000.5.1)
(85)翻訳文提出日 平成13年10月26日(2001.10.26)
(86)国際出願番号 P C T / U S 0 0 / 1 1 7 1 5
(87)国際公開番号 W O 0 0 / 6 6 1 8 1
(87)国際公開日 平成12年11月9日(2000.11.9)
(31)優先権主張番号 6 0 / 1 3 1 , 5 7 9
(32)優先日 平成11年4月29日(1999.4.29)
(33)優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイ
ション
アメリカ合衆国 02114 マサチューセッ
ツ州 ボストン フルーツ ストリート
(番地なし)
(72)発明者 ブッシュ, アシュレイ アイ.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ
02143, サマービル ナンバー3, サ
マー ストリート 91
(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アルツハイマー病を処置する際に有用な薬物についてスクリーニングする方法

(57)【要約】

本発明は、アルツハイマー病 (AD) および/または関連する病理学的状態の処置および/または予防において使用される候補薬物を同定するための方法に関する。詳細には、その方法は、その薬剤が酸素依存性過酸化水素形成活性を阻害するがスーパーオキシド依存性過酸化水素形成は阻害せず、その方法が以下: (a) A β 含有サンプルにその薬剤を添加する工程; (b) 溶存酸素依存性過酸化水素形成をその薬剤が阻害し得るか否かを決定する工程; および (c) そのスーパーオキシド依存性過酸化水素形成をその薬剤が阻害し得ないか否かを決定する工程、を包含する。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アルツハイマー病および／またはその症状の処置において使用される薬剤の同定のための方法であって、該薬剤が酸素依存性過酸化水素形成活性を阻害するがスーパーオキシド依存性過酸化水素形成は阻害せず、該方法が以下：

- (a) A β 含有サンプルに該薬剤を添加する工程；
 - (b) 溶存酸素依存性過酸化水素形成を該薬剤が阻害し得るか否かを決定する工程；および
 - (c) 該スーパーオキシド依存性過酸化水素形成を該薬剤が阻害し得ないか否かを決定する工程、
- を包含する、方法。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の方法であって、前記薬剤がスーパーオキシド依存性過酸化水素形成を阻害し得ないか否かを決定する方法を、パルス放射線分解または NBT アッセイを使用して実行する、方法。

【請求項 3】 請求項 1 に記載の方法であって、前記薬剤がスーパーオキシド依存性過酸化水素形成を阻害する能力の決定を、A β が Cu (I)、Fe (I) または H₂O₂ を触媒的に生成し得るか否かを決定することにより行う、方法。

【請求項 4】 アルツハイマー病および／またはその症状の処置において使用される薬剤の同定のための方法であって、該薬剤が A β による Cu (I) の生成を変化させ得、該方法が以下：

- (a) 第 1 の A β サンプルに Cu (II) を添加する工程；
- (b) Cu (I) が生成するに十分な時間該第 1 のサンプルをインキュベートさせる工程；
- (c) 第 2 の A β サンプルに Cu (II) を添加する工程であって、該第 2 のサンプルがさらに候補薬物を含む、工程；
- (d) 該第 1 のサンプルと同じ時間該第 2 のサンプルをインキュベートさせる工程；
- (e) 該第 1 のサンプルおよび該第 2 のサンプルにより生成される Cu (I)

の量を決定する工程；ならびに

(f) 該第1のサンプルにより生成されるCu(I)の量を該第2のサンプルにより生成されるCu(I)の量と比較する工程を包含し、

それにより該第2のサンプルと比較した該第1のサンプルにより生成されるCu(I)の量の差異が、該候補薬物がAβによるCu(I)の生成を変化させたことを示す、方法。

【請求項5】 請求項4に記載の方法であって、前記第1のサンプルおよび前記第2のサンプル中に存在するCu(I)の量を、以下：

(a) 該第1のサンプルおよび該第2のサンプルに錯化剤を添加する工程であって、該錯化剤がCu(I)と結合して錯化合物を形成し得、該錯化合物が最適な可視吸収波長を有する、工程；

(b) 該第1のサンプルおよび第2のサンプルの吸光率を測定する工程；ならびに

(c) 該第1のサンプルおよび第2のサンプル中のCu(I)の濃度を、(b)で得た吸光率を使用して算出する工程、
によって決定する、方法。

【請求項6】 請求項5に記載の方法であって、前記錯化剤がバトクプロイニスルホン酸アニオンである、方法。

【請求項7】 請求項4に記載の方法であって、該方法がマイクロタイタープレートにて実施され、そして前記吸光率の測定がプレートリーダーにより実施される、方法。

【請求項8】 請求項4に記載の方法であって、2つ以上の異なる試験候補薬剤を、AβによるCu(I)の生成を変化させる能力について同時に評価する、方法。

【請求項9】 請求項4に記載の方法であって、前記第1のAβサンプルおよび第2のAβサンプルが生物学的サンプルである、方法。

【請求項10】 請求項9に記載の方法であって、前記生物学的サンプルが脳脊髄液である、方法。

【請求項11】 アルツハイマー病および/またはその症状の処置において

(4)

使用される薬剤の同定のための方法であって、該薬剤がAβによるFe(II)の生成を変化させ得、該方法が以下：

- (a) 第1のAβサンプルにFe(III)を添加する工程；
 - (b) Fe(II)が生成するに十分な時間該第1のサンプルをインキュベートさせる工程；
 - (c) 第2のAβサンプルにFe(III)を添加する工程であって、該第2のサンプルがさらに候補薬物を含む、工程；
 - (d) 該第1のサンプルと同じ時間該第2のサンプルをインキュベートさせる工程；
 - (e) 該第1のサンプルおよび該第2のサンプルにより生成されるFe(II)の量を決定する工程；ならびに
 - (f) 該第1のサンプル中に存在するFe(II)の量を該第2のサンプル中に存在するFe(II)の量と比較する工程を包含し、
- それにより該第2のサンプルと比較した該第1のサンプル中に存在するFe(II)の量の差異が、該候補薬物がAβによるFe(II)の生成を変化させたことを示す、方法。

【請求項12】 請求項11に記載の方法であって、前記第1のサンプルおよび前記第2のサンプル中に存在するFe(II)の量を、以下：

- (a) 該第1のサンプルおよび該第2のサンプルに錯化剤を添加する工程であって、該錯化剤がFe(II)と結合して錯化合物を形成し得、該錯化合物が最適な可視吸収波長を有する、工程；
 - (b) 該第1のサンプルおよび第2のサンプルの吸光率を測定する工程；ならびに
 - (c) 該第1のサンプルおよび第2のサンプル中のFe(II)の濃度を、(b)で得た吸光率を使用して算出する工程、
- によって決定する、方法。

【請求項13】 請求項12に記載の方法であって、前記錯化剤がバトフェナントロリンニスルホン酸(BP)アニオンである、方法。

【請求項14】 請求項11に記載の方法であって、該方法がマイクロタイ

タープレートにて実施され、そして前記吸光率の測定がプレートリーダーにより実施される、方法。

【請求項 15】 請求項 11 に記載の方法であって、2 つ以上の異なる試験候補薬剤を、 $A\beta$ による $Fe(III)$ の生成を変化させる能力について同時に評価する、方法。

【請求項 16】 請求項 11 に記載の方法であって、前記第 1 の $A\beta$ サンプルおよび第 2 の $A\beta$ サンプルが生物学的サンプルである、方法。

【請求項 17】 請求項 16 に記載の方法であって、前記生物学的サンプルが脳脊髄液である、方法。

【請求項 18】 アルツハイマー病および／またはその症状の処置において使用される薬剤の同定のための方法であって、該薬剤が $A\beta$ による H_2O_2 の生成を変化させ得、該方法が以下：

(a) 第 1 の $A\beta$ サンプルに $Cu(II)$ または $Fe(III)$ を添加する工程；

(b) H_2O_2 が生成するに十分な時間該第 1 のサンプルをインキュベートさせる工程；

(c) 第 2 の $A\beta$ サンプルに $Cu(II)$ または $Fe(III)$ を添加する工程であって、該第 2 のサンプルがさらに候補薬物を含む、工程；

(d) 該第 1 のサンプルと同じ時間該第 2 のサンプルをインキュベートさせる工程；

(e) 該第 1 のサンプルおよび該第 2 のサンプルにより生成される H_2O_2 の量を決定する工程；ならびに

(f) 該第 1 のサンプル中に存在する H_2O_2 の量を該第 2 のサンプル中に存在する H_2O_2 の量と比較する工程を包含し、

それにより該第 2 のサンプルと比較した該第 1 のサンプル中に存在する H_2O_2 の量の差異が、該候補薬物が $A\beta$ による H_2O_2 の生成を変化させたことを示す、方法。

【請求項 19】 請求項 18 に記載の方法であって、(a) および (b) の $A\beta$ サンプルが生物学的流体である、方法。

(6)

【請求項 20】 請求項 19 に記載の方法であって、前記生物学的流体が脳脊髄液である、方法。

【請求項 21】 請求項 18 に記載の方法であって、前記第 1 のサンプルおよび第 2 のサンプル中に存在する H_2O_2 の量の決定を、以下：

(a) 該第 1 のサンプルの第 1 のアリコートに、該サンプルにより生成される H_2O_2 のすべてを分解するに十分な量でカタラーゼを添加する工程；

(b) 該サンプルにより生成される H_2O_2 のすべてを捕捉するに十分な量で TCEP を、

(i) 該第 1 のサンプルの第 1 のアリコート；

(i i) 該第 1 のサンプルの第 2 のアリコート；および

(i i i) 該第 2 のサンプル

に添加する工程；

(c) (b) で得たサンプルを、該 TCEP が該 H_2O_2 のすべてを捕捉するに十分な時間インキュベートする工程；

(d) (c) で得たサンプルに DTNB を添加する工程；

(e) (d) で得たサンプルを TMB が生成するに十分な時間インキュベートする工程；

(f) (e) で得たサンプルの 412 nm での吸光率を測定する工程；ならびに

(g) 該第 1 のサンプルおよび第 2 のサンプル中の H_2O_2 の濃度を、(f) で得た吸光率を使用して算出する工程、

により決定する、方法。

【請求項 22】 請求項 18 に記載の方法であって、該方法がマイクロタイタープレートにて実施され、そして前記吸光率の測定がプレートリーダーにより実施される、方法。

【請求項 23】 請求項 18 に記載の方法であって、2 つ以上の異なる試験候補薬剤を、A β による H_2O_2 の生成を変化させる能力について同時に評価する、方法。

【請求項 24】 アルツハイマー病および／またはその症状の処置において

使用される薬剤の同定のための方法であって、該薬剤がA β の毒性を減少させ得、該方法が以下：

- (a) 第1の細胞培養物にA β を添加する工程；
- (b) 第2の細胞培養物にA β を添加する工程であって、該第2の細胞培養物がさらに候補薬物を含む、工程；
- (c) 該第1のサンプルおよび第2のサンプル中のA β の神経毒性のレベルを決定する工程；ならびに
- (d) 該第1のサンプルおよび第2のサンプル中の神経毒性のレベルを比較する工程を包含し、

それにより該第1のサンプルと比較して該第2のサンプル中で低い神経毒性レベルが、該候補薬物がA β の神経毒性を減少させたこと、およびそれによりアルツハイマー病および／またはその症状を処置するために使用され得ることを示す、方法。

【請求項25】 請求項24に記載の方法であって、前記A β の神経毒性をMTTアッセイを使用して決定する、方法。

【請求項26】 請求項24に記載の方法であって、前記A β の神経毒性をLDH放出アッセイを使用して決定する、方法。

【請求項27】 請求項24に記載の方法であって、前記A β の神経毒性を生／死アッセイを使用して決定する、方法。

【請求項28】 請求項24に記載の方法であって、前記細胞がラット癌細胞である、方法。

【請求項29】 請求項24に記載の方法であって、前記細胞がラット初代前頭ニューロン細胞である、方法。

【請求項30】 薬剤がA β によるCu(I)の生成を変化させ得るか否かを決定するためのキットであって、容器手段を含み、該容器手段が、1つ以上の入れ物手段をその中に厳重に拘束して収容するように仕切られており、

- (a) 第1の入れ物手段がA β ペプチドを含むペプチドを含み；
- (b) 第2の入れ物手段がCu(II)塩を含み；そして
- (c) 第3の入れ物手段がBCアニオンを含む、

キット。

【請求項 3 1】 請求項 3 0 に記載のキットであって、前記 A β ペプチドが、約 10 μ M ~ 約 25 μ M の濃度で、水性緩衝液または生理学的溶液中の溶液として存在する、キット。

【請求項 3 2】 薬剤が A β による Fe (II) の生成を変化させ得るか否かを決定するためのキットであって、容器手段を含み、該容器手段が、1 つ以上の入れ物手段をその中に厳重に拘束して収容するように仕切られており、

(a) 第 1 の入れ物手段が A β ペプチドを含むペプチドを含み；

(b) 第 2 の入れ物手段が Fe (III) 塩を含み；そして

(c) 第 3 の入れ物手段が BP アニオンを含む、

キット。

【請求項 3 3】 請求項 3 2 に記載のキットであって、前記 A β ペプチドが、約 10 μ M ~ 約 25 μ M の濃度で、水性緩衝液または生理学的溶液中の溶液として存在する、キット。

【請求項 3 4】 薬剤が A β による H₂O₂ の生成を変化させ得るか否かを決定するためのキットであって、容器手段を含み、該容器手段が、1 つ以上の入れ物手段をその中に厳重に拘束して収容するように仕切られており、

(a) 第 1 の入れ物手段が A β ペプチドを含むペプチドを含み；

(b) 第 2 の入れ物手段が Cu (II) 塩を含み；

(c) 第 3 の入れ物手段が TCEP を含み；そして

(d) 第 4 の入れ物手段が DTNB を含む、

キット。

【請求項 3 5】 請求項 3 4 に記載のキットであって、前記 A β ペプチドが、約 10 μ M ~ 約 25 μ M の濃度で、水性緩衝液または生理学的溶液中の溶液として存在する、キット。

【請求項 3 6】 アルツハイマー病および／またはその症状の処置において使用される薬剤の同定のための方法であって、該薬剤が酸化還元反応性金属媒介性 A β 架橋を阻害し得、該方法が以下：

(a) 第 1 の A β サンプルに酸化還元反応性金属を添加する工程；

(9)

(b) A β 架橋を可能にするに十分な時間該第 1 のサンプルをインキュベートさせる工程；

(c) 第 2 の A β サンプルに該酸化還元反応性金属を添加する工程であって、該第 2 のサンプルがさらに候補薬物を含む、工程；

(d) 該第 1 のサンプルと同じ時間該第 2 のサンプルをインキュベートさせる工程；

(e) 該第 1 のサンプルおよび第 2 のサンプルの各々からアリコートを取り出す工程；ならびに

(f) 該第 1 のサンプルおよび第 2 のサンプル中の架橋の存在または非存在を決定する工程を包含し、

それにより該第 1 のサンプルと比較した該第 2 のサンプル中の A β 架橋の非存在が、該候補薬物が A β 架橋を阻害したことを示す、方法。

【請求項 37】 請求項 36 に記載の方法であって、(f) にて、ウェスタンブロット分析を実施して、前記第 1 のサンプルおよび第 2 のサンプル中の架橋の存在または非存在を決定する、方法。

【請求項 38】 アルツハイマー病および／またはその症状を処置する方法であって、請求項 1、4、11、18、24 または 36 に記載のスクリーニングアッセイにより同定される薬剤の有効量を、該処置が必要な患者に投与する工程を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(連邦政府後援の研究開発のもとで行われた発明に対する権利に関する言及)

本発明の開発の際に行われた研究の部分は、アメリカ国立衛生研究所からの助成金番号R29AG12686のもとで米国政府の基金を利用した。政府は、本発明に対して特定の権利を有し得る。

【0002】

(本発明の背景)

アルツハイマー病(AD)の神経病理は、顕著な新皮質のA β 沈着および酸化ストレスの兆候により特徴付けられる。AD患者の新皮質における酸化ストレスの代謝性兆候、広範な酸素ラジカル媒介脳損傷、酸化ストレスの全身的兆候および抗酸化系の応答は、全てADにおいて観察されている(Martins, R. N. ら、J. Neurochem. 46:1042~1045 (1986); Smith, M. A. ら、Nature 382:120~121 (1996); Ceballos-Picot, I ら、Free Radic. Biol. Med. 20(4):579-87 (1996); Nunomura, A ら、J. Neurosci. 19(6):1959-64 (1999))。実際、酸化傷害の寛解は、AD被験体におけるビタミンE処置の臨床的利点についての根拠であり得る(Sano, M ら、N. Engl. J. Med. 336:1216~1222 (1997))。

【0003】

A β は、CuおよびZnに同時に結合するダイマーである。(Huang, X ら、J. Biol. Chem. 272:26464-26470 (1997); Atwood, C. S. ら、Journal of Biological Chemistry 273:12817-12826 (1998); Lovell, M. A. ら、J. Neurol. Sci. 158(1):47~52 (1998); Huang, X ら、Biochemistry 38:7609~7616 (1999); Garzon-Rodriguez, W ら、J. Biol. Chem. 272:21037~21044 (1997))。これは、酸化的

ストレスにより細胞から放出される。しかし、ADにおけるその正常な機能および役割は明確でない。Aベータ ($A\beta$) のポリマーは、4.3 kDで、膜貫通タンパク質の39~43アミノ酸ペプチド産物で、アミロイドタンパク質前駆体 (APP) であり、これは、ADに罹患したものの脳に見出される神経突起および血管性のアミロイド沈着から抽出された主要な成分である。 $A\beta$ 沈着は、通常、高い神経細胞死の領域において最も濃縮されており、種々の形態 (非晶質性 (アモルファス) 沈着、プラークアミロイド、およびアミロイドコンゴ好染血管障害を含む) で、存在し得る (Masters, C. L. ら、EMBO J. 4: 2757 (1985); Masters, C. L. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4245 (1985))。 $A\beta$ 沈着は、炎症性応答タンパク質で装飾される。さらに、重篤な酸化的ストレスの生化学的マーカー (例えば、過酸化付加物、進行型グリケーション最終産物、およびタンパク質架橋) が、この沈着のごく近位に配置される。

【0004】

現在まで、 $A\beta$ 沈着の原因は未知である。しかし、沈着物形成を防止することは、AD処置の手段となり得ると考えられている。なぜなら、 $A\beta$ 沈着は、神経死と密接に関連しており、ADにおいて痴呆をもたらすことを示唆する証拠が増えているからである。より詳細には、遺伝的研究により、ADの病原において $A\beta$ の42残基 ($A\beta_{1-42}$) 形態が強力に関連付けられた (Maury, C. P. J. Lab. Investing. 72: 4~16 (1995); Multhaup, G. ら、Nature 325: 733-736 (1987))。 $A\beta_{1-42}$ (生物学的液体のわずかな成分であるが) は、 $A\beta$ 沈着において高度に濃縮されている。このことは、 $A\beta_{1-42}$ が他の神経毒性 $A\beta$ 種よりも病原性であることを示唆する。例えば、Kuo, Y-M ら、J. Biol. Chem. 271: 4077~81 (1996); Roher, A. E. ら J. Biol. Chem. 271: 20631~20635 (1996) を参照のこと。

【0005】

アミロイドの全身沈着は、通常、炎症性応答と関連する (Pepys, M. B. および Baltz, M. L. Adv. Immunol. 34: 141~212

(1983) ; Cohen, A. S. *Arthritis and Allied Conditions* D. J. McCarty編、Lea and Febiger, Philadelphia (1989) 第1273~1293頁 ; Kisiievsky, R. , *Lab. Investing.* 49 : 381~390 (1983))。例えば、血清アミロイドA (炎症中に上昇する、主要な急性期反応体 (acute phase reactant) タンパク質の1つ) は、慢性炎症中の種々の組織に沈着するアミロイドAタンパク質の前駆体であり、第二のアミロイド症 (アミロイドーシス) をもたらす (Gorevic, P. D. , ら、*Ann. NY Acad. Sci.* : 380~393 (1982))。炎症性機構の関与は、ADにおけるプラーク形成に寄与することが示唆されている (Kisiievsky, R. , *Mol. Neurobiol.* 49 : 65~66 (1994))。急性期タンパク質 (例えば、 α 1-抗キモトリプシンおよびC反応性のタンパク質)、補体系の要素、ならびに活性化小グリア細胞およびアストログリア細胞がADの脳におい一貫して見出される。

【0006】

神経毒性A β アミロイドの形成の根底にある機構は、なお未解明である。A β の過剰発現のみでは、アミロイド形成は十分に説明できない。なぜなら、凝集に必要なA β の濃度は、生理学的にはありそうにないからである。さらに、神経化学的環境における変質が、アミロイド形成に必要である。なぜなら、A β 1-42の存在は、生物学的液体 (例えば、脳脊髄液 (CSF)) において正常であるからである (Shoji, M. , *Science* 258 : 126 (1992) ; Goldeら、*Science* 255 (5045) : 728~730 (1992) ; Seubert, Pら、*Nature* 359 : 325 (1992) ; Haassら、*Nature* 359 : 322 (1992))。

【0007】

アミロイドを形成するためのA β の神経化学的脆弱性への研究は、アミロイド形成に関する最も確率の高い説明として、変化した亜鉛および[H⁺]の恒常性を示唆する。なぜなら、A β は、インビトロにおける弱い酸性条件 (pH 3.5~6.5) 下で容易に沈殿されるからであり (Barrow C. J. およびZ

agorski M. G. , Science 253:179~182 (1991) ; Fraser, P. E. ら , Biophys. J. 60:1190~1201 (1991) ; Barrow, C. J. ら , J. Mol. Biol. 225:1075~1093 (1992) ; Burdick, D. J. Biol. Chem. 267:546~554 (1992) ; Zagorski, M. G. および Barrow, C. J. Biochemistry 31:5621~5631 (1992) ; Kirshenbaum, K. および Daggett, V. , Biochemistry 34:7629~7639 (1995) ; Wood, S. J. ら , J. Mol. Biol. 256:870~877 (1996))、そしてレドックス不活性Zn (II) の存在、そしてより少ない程度において、レドックス活性Cu (II) およびFe (III) の存在が、可溶性A β の沈殿を顕著に増大するからである (Bush, A. I. ら, J. Biol. Chem. 268:16109 (1993) ; Bush, A. I. ら, J. Biol. Chem. 269:12152 (1994) ; Bush, A. I. ら, Science 265:1464 (1994) ; Bush, A. I. ら, Science 268:1921 (1995))。亜鉛は、ADにおいて異常な代謝であり、そしてA β が凝集する脳の領域において、非常に濃縮される。

【0008】

しかし、二価金属イオンキレート剤の存在下でのZn (II) 誘導A β 1~40凝集の完全な再現性は、亜鉛結合が、可逆性の、A β の正常機能であることを示唆し、そしてA β 沈着の形成における他の神経化学機構を意図する。従って、非可逆性のA β 凝集 (例えば、アミロイドプラーク中に存在するA β ポリマー種の形成におけるA β モノマーの架橋) に関与するプロセスは、神経毒性A β 沈着の形成についてのよりもっともらしい説明である。

【0009】

銅 (I) への銅 (II) のAPPによる還元は、非可逆性A β 凝集および架橋を導き得る。より詳細には、この反応は、水酸化ラジカルの生成を増強する環境を促進し得、これはADにおける酸化ストレスに寄与し得る (Multhaup, Gら, Science 271:1406~1409 (1996))。異常

なCu代謝についての前例は、既に、ウィルソン病およびメンケス症候群の神経変性性障害において存在し、そして可能性としては家族性筋萎縮性側索硬化症において存在する (Tanzi, R. E. ら、Nature Genetics 5: 344 (1993))。

【0010】

ADに関連する基礎的な病理、遺伝的感受性および生物学は、明確になりつつあるが、この疾患を予防または治療するのに効果的な薬物を開発するための理論的な化学的基礎および構造的基礎は、なお理解しにくいままである。ADの遺伝学は、A β の代謝が上記のような疾患の病因と密接に関連していることを示すが、ADの処置のための薬物は、従来、「認識エンハンサー (cognition enhancer)」に集中してきた。これは、疾患プロセスの基礎に取り組むものではない。

【0011】

(発明の要旨)

本発明は、A β の神経毒性およびA β ポリマーの形成を減少するために使用され得る薬剤の同定に関し、そしてADおよび／またはADの症状を予防、処置または緩和する方法を開発するためのそのような薬剤の使用に関する。より詳細には、本発明は、ADを処置するために使用され得る薬剤の同定に関する。

【0012】

A β が抗酸化剤として機能する (すなわち、O₂からH₂O₂を生成する) 能力は多くの場合有益であり得るので、本発明はまた、ADおよびその症状の処置および／または予防において使用される薬剤を同定するための方法に関し、その薬剤は、A β のSOD様活性 (すなわち、抗酸化剤として機能するA β の能力) を妨げることなく、H₂O₂を生成するO₂とA β との相互作用を妨げ得る。

【0013】

従って、本発明は、ADおよび／またはその症状の処置および／または予防において使用される薬剤の同定のための方法に関し、その薬剤が酸素依存性過酸化水素形成活性を阻害するがスーパーオキシド依存性過酸化水素形成は阻害せず、その方法が以下：

- (a) A β 含有サンプルにその薬剤を添加する工程；
- (b) 溶存酸素依存性過酸化水素形成をその薬剤が阻害し得るか否かを決定する工程；および
- (c) そのA β 触媒性スーパーオキシド依存性過酸化水素形成をその薬剤が阻害し得ないか否かを決定する工程、を包含する。

【0014】

好ましい実施形態において、上記薬剤がスーパーオキシド依存性過酸化水素形成を阻害し得ないか否かを決定する方法を、パルス放射線分解またはNBTアッセイを使用して実行する。

【0015】

好ましい実施形態において、上記薬剤がA β 触媒性スーパーオキシド依存性過酸化水素形成を阻害する能力の決定を、A β がCu(I)、Fe(II)またはH₂O₂を触媒的に生成し得るか否かを決定することにより行う。

【0016】

本発明はさらに、ADおよび／またはその症状の処置および／または予防において使用される薬剤の同定のための方法に関し、その薬剤がA β によるCu(I)の生成を変化させ得、その方法が以下：

- (a) 第1のA β サンプルにCu(II)を添加する工程；
- (b) Cu(I)が生成するに十分な時間、その第1のサンプルをインキュベートさせる工程；
- (c) 第2のA β サンプルにCu(II)を添加する工程であって、その第2のサンプルがさらに候補薬物を含む、工程；
- (d) その第1のサンプルと同じ時間、その第2のサンプルをインキュベートさせる工程；
- (e) その第1のサンプルおよびその第2のサンプルにより生成されるCu(I)の量を決定する工程；ならびに
- (f) その第1のサンプルにより生成されるCu(I)の量を、その第2のサンプルにより生成されるCu(I)の量と比較する工程を包含し、
それによりその第2のサンプルと比較したその第1のサンプルにより生成され

るCu(I)の量の差異が、その候補薬物がAβによるCu(I)の生成を変化させたことを示す。

【0017】

好ましい実施形態において、上記第1のサンプルおよび上記第2のサンプル中に存在するCu(I)の量を、以下：

(a) その第1のサンプルおよびその第2のサンプルに錯化剤を添加する工程であって、その錯化剤がCu(I)と結合して錯化合物を形成し得、その錯化合物が最適な可視吸収波長を有する、工程；

(b) その第1のサンプルおよび第2のサンプルの吸光率を測定する工程；ならびに

(c) その第1のサンプルおよび第2のサンプル中のCu(I)の濃度を、(b)で得た吸光率を使用して算出する工程、
によって決定する。

【0018】

好ましい実施形態において、上記方法がマイクロタイタープレートにて実施され、そして上記吸光率の測定がプレートリーダーにより実施される。

【0019】

好ましい実施形態において、2つ以上の異なる試験候補薬剤を、AβによるCu(I)の生成を変化させる能力について同時に評価する。

【0020】

好ましい実施形態において、上記第1のAβサンプルおよび第2のAβサンプルが生物学的サンプル（例えば、CSF）である。

【0021】

その方法はさらに、ADおよび／またはその症状の処置および／または予防において使用される薬剤の同定のための方法に関し、その薬剤がAβによるFe(II)の生成を変化させ得、その方法が以下：

(a) 第1のAβサンプルにFe(III)を添加する工程；

(b) Fe(II)が生成するに十分な時間、その第1のサンプルをインキュベートさせる工程；

(c) 第2のAβサンプルにFe(III)を添加する工程であって、その第2のサンプルがさらに候補薬物を含む、工程；

(d) その第1のサンプルと同じ時間、その第2のサンプルをインキュベートさせる工程；

(e) その第1のサンプルおよびその第2のサンプルにより生成されるFe(III)の量を決定する工程；ならびに

(f) その第1のサンプル中に存在するFe(III)の量を、その第2のサンプル中に存在するFe(III)の量と比較する工程を包含し、

それによりその第2のサンプルと比較したその第1のサンプル中に存在するFe(III)の量の差異が、その候補薬物がAβによるFe(III)の生成を変化させたことを示す。

【0022】

好ましい実施形態において、上記第1のサンプルおよび上記第2のサンプル中に存在するFe(III)の量を、以下：

(a) その第1のサンプルおよびその第2のサンプルに錯化剤を添加する工程であって、その錯化剤がFe(III)と結合して錯化合物を形成し得、その錯化合物が最適な可視吸収波長を有する、工程；

(b) その第1のサンプルおよび第2のサンプルの吸光率を測定する工程；ならびに

(c) その第1のサンプルおよび第2のサンプル中のFe(III)の濃度を、
(b)で得た吸光率を使用して算出する工程、
によって決定する。

【0023】

好ましい実施形態において、上記方法がマイクロタイタープレートにて実施され、そして上記吸光率の測定がプレートリーダーにより実施される。

【0024】

好ましい実施形態において、2つ以上の異なる試験候補薬物を、AβによるFe(III)の生成を変化させる能力について同時に評価する。

【0025】

好ましい実施形態において、上記第1のA β サンプルおよび第2のA β サンプルが生物学的サンプル（例えば、CSF）である。

【0026】

本発明はさらに、ADおよび／またはその症状の処置および／または予防において使用される薬剤の同定のための方法に関し、その薬剤がA β によるH₂O₂の生成を変化させ得、その方法が以下：

(a) 第1のA β サンプルにCu(II)またはFe(III)を添加する工程；

(b) H₂O₂が生成するに十分な時間、その第1のサンプルをインキュベートさせる工程；

(c) 第2のA β サンプルにCu(II)またはFe(III)を添加する工程であって、その第2のサンプルがさらに候補薬物を含む、工程；

(d) その第1のサンプルと同じ時間、その第2のサンプルをインキュベートさせる工程；

(e) その第1のサンプルおよびその第2のサンプルにより生成されるH₂O₂の量を決定する工程；ならびに

(f) その第1のサンプル中に存在するH₂O₂の量をその第2のサンプル中に存在するH₂O₂の量と比較する工程を包含し、

それによりその第2のサンプルと比較したその第1のサンプル中に存在するH₂O₂の量の差異が、その候補薬物がA β によるH₂O₂の生成を変化させたことを示す。

【0027】

好ましい実施形態において、(a) および (b) のA β サンプルが生物学的流体（例えば、CSF）である

好ましい実施形態において、上記第1のサンプルおよび第2のサンプル中に存在するH₂O₂の量の決定を、以下：

(a) その第1のサンプルの第1のアリコートに、そのサンプルにより生成されるH₂O₂のすべてを分解するに十分な量でカタラーゼを添加する工程；

(b) そのサンプルにより生成されるH₂O₂のすべてを捕捉するに十分な量で

TCEPを、

- (i) その第1のサンプルの第1のアリコート；
- (ii) その第1のサンプルの第2のアリコート；および
- (iii) その第2のサンプル

に添加する工程；

(c) (b) で得たサンプルを、そのTCEPがその H_2O_2 のすべてを捕捉するに十分な時間インキュベートする工程；

(d) (c) で得たサンプルにDTNBを添加する工程；

(e) (d) で得たサンプルをTMBが生成するに十分な時間インキュベートする工程；

(f) (e) で得たサンプルの412nmでの吸光率を測定する工程；ならびに

(g) その第1のサンプルおよび第2のサンプル中の H_2O_2 の濃度を、(f) で得た吸光率を使用して算出する工程、
により決定する。

【0028】

好ましい実施形態において、上記方法がマイクロタイタープレートにて実施され、そして上記吸光率の測定がプレートリーダーにより実施される。

【0029】

好ましい実施形態において、2つ以上の異なる試験候補薬剤を、A β による H_2O_2 の生成を変化させる能力について同時に評価する。

【0030】

本発明はさらに、ADおよび／またはその症状の処置および／または予防において使用される薬剤の同定のための方法であって、その薬剤がA β の毒性を減少させ得、その方法が以下：

- (a) 第1の細胞培養物にA β を添加する工程；
- (b) 第2の細胞培養物にA β を添加する工程であって、その第2の細胞培養物がさらに候補薬物を含む、工程；
- (c) その第1のサンプルおよび第2のサンプル中のA β の神経毒性のレベル

を決定する工程；ならびに

(d) その第1のサンプルおよび第2のサンプル中の神経毒性のレベルを比較する工程を包含し、

それによりその第1のサンプルと比較してその第2のサンプル中で低い神経毒性レベルが、その候補薬物がA β の神経毒性を減少させたこと、およびそれによりADおよび／またはその症状を処置および／または予防するために使用され得ることを示す。

【0031】

好ましい実施形態において、A β の神経毒性を、MTTアッセイ、LDH放出アッセイあるいは生／死アッセイ（例えば、Live/Dead Eukolight Viability/Cytotoxicity Assay (Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR) から市販)）を使用して決定する。

【0032】

好ましい実施形態において、上記細胞が、ラット癌細胞またはラット初代前頭ニューロン細胞である。

【0033】

本発明はさらに、薬剤がA β によるCu(I)の生成を変化させ得るか否かを決定するためのキットに関し、そのキットは、容器手段を含み、その容器手段が、1つ以上の入れ物手段をその中に厳重に拘束して収容するように仕切られており、

(a) 第1の入れ物手段がA β ペプチドを含むペプチドを含み；

(b) 第2の入れ物手段がCu(II)塩を含み；そして

(c) 第3の入れ物手段がBCアニオンを含む。

【0034】

好ましい実施形態において、上記A β ペプチドが、約10 μ M～約25 μ Mの濃度で、水性緩衝液または生理学的溶液中の溶液として存在する。

【0035】

本発明はさらに、薬剤がA β によるFe(II)の生成を変化させ得るか否か

を決定するためのキットに関し、そのキットは、容器手段を含み、その容器手段が、1つ以上の入れ物手段をその中に厳重に拘束して収容するように仕切られており、

- (a) 第1の入れ物手段がA β ペプチドを含むペプチドを含み；
- (b) 第2の入れ物手段がFe(III)塩を含み；そして
- (c) 第3の入れ物手段がBPアニオンを含む。

【0036】

好ましい実施形態において、上記A β ペプチドが、約10 μ M～約25 μ Mの濃度で、水性緩衝液または生理学的溶液中の溶液として存在する。

【0037】

本発明はさらに、薬剤がA β によるH₂O₂の生成を変化させ得るか否かを決定するためのキットに関し、そのキットは、容器手段を含み、その容器手段が、1つ以上の入れ物手段をその中に厳重に拘束して収容するように仕切られており、

- (a) 第1の入れ物手段がA β ペプチドを含むペプチドを含み；
- (b) 第2の入れ物手段がCu(II)塩を含み；
- (c) 第3の入れ物手段がTCEPを含み；そして
- (d) 第4の入れ物手段がDTNBを含む。

【0038】

好ましい実施形態において、上記A β ペプチドが、約10 μ M～約25 μ Mの濃度で、水性緩衝液または生理学的溶液中の溶液として存在する。

【0039】

本発明はさらに、ADおよび／またはその症状の処置および／または予防において使用される薬剤の同定のための方法に関し、その薬剤が酸化還元反応性金属媒介性A β 架橋を阻害し得、その方法が以下：

- (a) 第1のA β サンプルに酸化還元反応性金属を添加する工程；
- (b) A β 架橋を可能にするに十分な時間、その第1のサンプルをインキュベートさせる工程；
- (c) 第2のA β サンプルにその酸化還元反応性金属を添加する工程であって、その第2のサンプルがさらに候補薬物を含む、工程；

(d) その第1のサンプルと同じ時間、その第2のサンプルをインキュベートさせる工程；

(e) その第1のサンプルおよび第2のサンプルの各々からアリコートを取り出す工程；ならびに

(f) その第1のサンプルおよび第2のサンプル中の架橋の存在または非存在を決定する工程を包含し、

それによりその第1のサンプルと比較したその第2のサンプル中のA β 架橋の非存在が、その候補薬物がA β 架橋を阻害したことを示す。

【0040】

好ましい実施形態において、(f)にて、ウェスタンブロット分析を実施して、上記第1のサンプルおよび第2のサンプル中の架橋の存在または非存在を決定する。

【0041】

本発明はさらに、ADおよび／またはその症状を処置する方法に関し、上記のスクリーニングアッセイのいずれか1つまたは組み合わせにより同定される薬剤の有効量を、その処置が必要な患者に投与する工程を包含する。

【0042】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

本発明は、A β ペプチドが、豊富な反応性酸素種(ROS)の生成を介して酸化ストレスを直接生成するという予期しない発見に関する。ROSの生成は、金属(Cuおよび／またはFe)依存性のpH媒介性機構によって生じ、ここで、A β は、Cu(II)をCu(I)に還元するか、またはFe(III)をFe(II)に還元する。ADおよび老化した脳において、この反応は、引き続いて、基質として溶解したO₂を使用して、H₂O₂を生成し(Huang, 1997

#10132; Huang, 1997 #9963)、これは、その正常な基質であるO₂⁻についての特異性の喪失を反映し得、そして異常なH₂O₂の生成を導き、この生成は、ペプチドの凝集に関連し得る。従って、A β は、過剰なその生成物(H₂O₂)によって崩壊するようになる、スーパーオキシドスカベンジャーであり得、自己酸化的損傷およびタンパク質蓄積を引き起こす(Atwood

, C. S., ら, Soc. Neurosci. Abstr. 23:1883 (1997))。

【0043】

(定義)

明細書および特許請求の範囲の明瞭な理解を提供するために、以下の定義を提供する。

【0044】

A β ペプチドはまた、当該分野において、A β 、 β タンパク質、 β -A4およびA4として公知である。本発明において、A β ペプチドは、ペプチドA β ₁₋₃₉、ペプチドA β ₁₋₄₀、ペプチドA β ₁₋₄₁、ペプチドA β ₁₋₄₂およびペプチドA β ₁₋₄₃から構成され得る。好ましい実施形態において、A β は、A β ₁₋₃₉、A β ₁₋₄₀、A β ₁₋₄₁、A β ₁₋₄₂、A β ₁₋₄₃およびそれらの混合物からなる群より選択される。なおより好ましくは、A β は、A β ₁₋₄₀またはA β ₁₋₄₂である。好ましい実施形態において、A β は、A β ₁₋₄₂である。本発明の最も好ましい実施形態は、A β ₁₋₄₀を利用する。しかし、A β ペプチドのいずれかは、本発明に従って利用され得る。A β の配列は、C. Hilbichら、J. Mol. Biol. 228:460-473 (1992)に見出される。A β ₁₋₄₂は、少数の可溶性種であるが、これは、より線維生成性(fibrillogenic)であり、間質A β 沈着物に豊富であり、そして家族性ADにおいて過剰産生される(Suzuki, N., ら, Science 264:1336-1340 (1994))。

【0045】

A β ₁₋₄₀ (可溶性A β の最も豊富な形態)のすべてのレドックス性質が、A β ₁₋₄₂において誇張される。A β ₁₋₄₂の誇張されたレドックス活性およびROSを生成する増大された能力が、その神経毒性性質を説明するようである。興味深いことに、A β のラットホモログ(亜鉛結合および亜鉛媒介性凝集を減弱することを示す3つの置換を有する)は、ヒト相対物よりも低いレドックス活性を示す。これは、ラットが、年齢とともにアミロイド病理を示さない唯一の哺乳動物である点において例外的である理由を説明し得る。現在までに分析されたすべての他

の哺乳動物は、ヒトA β 配列を有する。

【0046】

当該分野において一般に公知であり、そして本明細書において意図されるように、アミロイドは、凝集したタンパク質の形態である。

【0047】

A β アミロイドは、凝集したA β ペプチドである。これは、ADおよび/またはダウン症候群に罹患した脳において見出され、そして以下の頭部損傷を蓄積し得る。

【0048】

本明細書中で使用されるような生理学的溶液は、生理学的なpH（約7.4）で化合物を含む溶液を意味し、そしてこれは、体液または生物学的流体（例えば、CSF、血液、血漿など）を厳密には示す。

【0049】

Zn(II)、Fe(III)、Fe(II)、Cu(II)およびCu(I)は、特に明記されない限り、金属の塩（すなわち、任意の形態、可溶性または不溶性の金属）を意味する。

【0050】

生物学的流体は、ヒトまたは動物から得られた流体を意味し、これは、そのヒトまたは動物によって産生される。生物学的流体の例としては、脳脊髄液（CSF）、血液、血清および血漿が挙げられるがこれらに限定されない。本発明において、「生物学的流体」は、生物学的流体全体、または任意の手段（例えば、限外濾過またはクロマトグラフィ）による精製によって誘導されるような流体の任意の画分を含む。

【0051】

(A β ペプチドのSOD様活性)

A β 媒介性スーパーオキシド不均化の金属依存性化学は、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）の活性をしるばせる。スーパーオキシドジスムターゼ1（SOD1、Cu/Zn SODとしてもまた公知）は、CuおよびZnを同時に結合し、そしてCu(II)活性部位を使用して、電子をスーパーオキシド(O

2')に移し、 H_2O_2 生成を生じる(Uchida, K. およびKawakishi, S., J. Biol. Chem. 269:2405-2410(1994))。それ故、高い親和性で Cu(II) に結合することによって、 $\text{A}\beta$ はまた、基質として O_2^- を使用し得るかもしれない。実施例3は、スーパーオキシドスカベンジング活性のための古典的なアッセイ(NBTアッセイ)において、 $\text{A}\beta$ でSOD1を置換することによるこの可能性についての試験を示す(Goldstein, S., ら、Free Radic Biol Med 4:295-303(1988)) (図12)。興味深いことに、SOD1の変異は、筋萎縮性側索硬化症、別の神経変性障害を引き起こす(Rosen, D., ら、Nature 364:362(1993))。SOD1は、主に細胞内であるが、一方、 $\text{A}\beta$ は、 $\text{A}\beta$ が蓄積する場所である細胞外空間において構成的に見出される。

【0052】

生存系における $\text{A}\beta$ のSOD様活性は、現在調査中であり、そしてデータは、今までに、 $\text{A}\beta_{1-42}$ を過剰発現する、細胞培養物およびトランスジェニック動物の両方(APP変異またはプレセニリン1過剰発現に起因する)が、スーパーオキシド媒介性ストレスに対して比較的耐性であることを明らかにした(Bush, A. I. ら、Soc. Neurosci. Abstr. 25:14(1999))。これらのインビボでの知見は、 $\text{A}\beta$ のスーパーオキシド抗酸化剤としての役割を支持し得る。ここで、インビボでのペプチドの産生は、細胞性抗酸化剤の応答系の一部であり得る。

【0053】

$\text{A}\beta$ の生理学的機能が、スーパーオキシド抗酸化剤である場合、次いで、 $\text{A}\beta$ のより長い形態(例えば、1-42)が、より強力な抗酸化剤として生成され得る。このデータ(実施例3)は、おそらく、 $\text{A}\beta_{1-40}$ よりも高い親和性で Cu(II) を結合する能力によって、 $\text{A}\beta_{1-42}$ が、 $\text{A}\beta_{1-40}$ よりも貪欲なスーパーオキシドのためのスカベンジャーのようであることを示す。 Cu(II) についての $\text{A}\beta_{1-42}$ のより高い親和性は、より長いペプチドの増大した β シート含量によって媒介され得る(Barrow, C. J., ら、J. Mol. Biol. 225:1075-1093(1992))、この増大した β シート含量は、SOD1

を含むキュプロタンパク質 (cuproprotein) におけるレドックス活性な Cu (II) 結合部位の共通の構造的特徴である (Frausto da Silva, J. J. R., および Williams, R. J. P., *The Biological Chemistry of the Elements*, Clarendon Press, Oxford (1991))。より大きな比率の A β ₁₋₄₂ の産生が、より過酷な酸化ストレスに対する生理学的応答を反映し得ることが仮定され、これは、増大した A β ₁₋₄₂ が、頭部損傷に対する応答として産生される理由であり得るか (Raby, C. A. ら、*J. Neurochem.* 71 (6) : 2505-9 (1998))、またはプレセニリンにおける家族性 AD 変異と関連するアポトーシスとして産生される理由であり得る (Wolozin, B., ら、*Science* 274 (5293) : 1710-3 (1996))。これは、家族性 AD 変異によって引き起こされる増大した A β ₁₋₄₂ 産生が、おそらく、有害な長期の結果を伴う生存応答を示し、従って、分子アンタゴニストの多面発現性の例であり得るという興味深い可能性を生じる。従って、SOD1 のように (Yim, M. B., ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (12) : 5709-14 (1996))、A β は、健康状態における抗酸化剤および疾患におけるプロ酸化剤 (prooxidant) であり得ることがさらに仮定される。A β のこの混成した抗酸化剤およびプロ酸化剤の性質は、組織学的アミロイド沈着物が、痴呆とあまり関連しない理由を説明し得る (Terry, R. D., ら、*Ann. Neurol.* 30 : 572-580 (1991))。A β は、細胞培養実験における神経毒性効果が、上昇した細胞の過酸化水素濃度によって媒介される場合に、マイクロモル濃度でプロ酸化剤として見なされる (Yankner, B. A., ら、*Science* 250 : 279-282 (1990) ; Behl, C., ら、*Cell* 77 : 817-827 (1994))。しかし、ペプチドは、より低い (ナノモル) 濃度で逆説的に神経栄養性である (Yankner, B. A., ら、*Science* 250 : 279-282 (1990))。

【0054】

SOD1 のように、A β は、マイクロモル以下の親和性で、Cu および Zn を

可逆的に結合し、そしてFe(III)に対するより弱い親和性を有する二量体タンパク質である(Bush, A. I., ら、J. Biol. Chem. 269: 12152-12158 (1994); Bush, A. I., ら、Science, 265: 1464-1467 (1994); Huang, X., ら、J. Biol. Chem. 272: 26464-26470 (1997); Atwood, C. S., ら、Journal of Biological Chemistry 273: 12817-12826 (1998))。これは、Cu(約0.4mM)、Zn(約1.0mM)およびFe(約1.0mM)が、ADにおけるA β 沈着物に非常に多量に豊富である理由を説明し得る(Lovell, M. A., ら、J. Neurol. Sci. 158(1): 47-52 (1998))。さらに、A β は、Cu(II)およびFe(III)を還元し、そしてA β が、強力に陽性な形式的な還元電位(+550mV対Ag/AgCl)を有することが最近見出された(Huangら、提出済)。

【0055】

CuおよびZnを結合し、そしてCu(II)およびFe(III)を還元する能力に鑑みて、A β のO $_2^-$ 不均化性質を、レーザーパルス光分解を使用して、 μ 秒のタイムスケールで研究した。これらの実験は、A β が、約 $10^8\text{M}^{-1}\text{秒}^{-1}$ (例えば、 $2.2 \times 10^8\text{M}^{-1}\text{秒}^{-1}$ (SOD1と著しく類似する))の不均化の速度定数で、Fe/Cu依存性SOD様活性を示すことを示した。この活性は、Zn(II)を用いたペプチドのメタル化(metaliation)によって、顕著に増大される。それ故、A β は、SOD1と同じ機能を有するような、良好な候補物のようである。さらに、家族性筋萎縮性側索硬化症における変異SOD1のように、A β は、ニューロンの損傷に関連して蓄積する別のスーパーオキシドスカベンジャーであり得る。これは、酸化ストレスが、細胞によるその放出を引き起こす理由を説明し得る(Frederikse, P. H., ら、J. Biol. Chem. 271: 10169 (1996))。しかし、A β が、酸化ストレスに対する反応に関与する場合、またはH $_2$ O $_2$ クリアランスが、細胞レベルで損なわれる場合、A β が蓄積し、より多くのO $_2$ を補充し、そしてより多くのROSを生成して、悪性のサイクルを導き、そして組織過酸化損傷およびタン

パク質架橋を局在化する。A β の濃度が上昇するにつれて、ペプチドは、スーパーオキシド基質についての特異性を喪失し、ジスムターゼ活性を喪失するようである（図15Aおよび15B）。そして、不適当に、酸素から過酸化水素を生成し始める。

【0056】

それ故、本発明は、溶解された酸素（O₂）からの大量の毒性の過酸化水素（H₂O₂）のA β 依存性生成（「プロ酸化剤」A β 活性）を阻害するが、H₂O₂へスーパーオキシド（O₂⁻）を変換する有益なA β 依存性活性（これは、次いで、他の細胞性酵素によって分解される（抗酸化剤A β 活性））を阻害しない薬剤の同定に関する。

【0057】

ADにおける遊離のラジカルおよびアミロイド形成についての提唱された機構は、以下のように説明される。

【0058】

（1）可溶性A β 種および沈殿したA β 種は、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）様活性を有する。スーパーオキシド（O₂⁻）（不均化のための基質）は、ミトコンドリアの呼吸代謝からの溢流、およびA β 自身の両方によって生成される（図11）。A β 媒介性不均化は、過酸化水素（H₂O₂）を生成し、反応の間に還元されるCu（I）またはFe（II）を必要とする。

【0059】

（2）H₂O₂は、比較的安定であり、細胞膜を横切って自由に浸透可能であり、そしてその生成から少し離れて酸化事象に寄与する。普通は、これは、酸素および水への細胞内カタラーゼおよび／またはグルタチオンペルオキシダーゼによって崩壊する。

【0060】

（3）しかし、老人およびADにおいて、H₂O₂のレベルは高く、そしてグルタチオン活性、カタラーゼ活性およびペルオキシダーゼ活性は低い。H₂O₂が完全には触媒されない場合、A β の付近で、還元されたCu（I）およびFe（I）と反応して、Fenton化学によって、ROS（例えば、非常に反応性の

ヒドロキシルラジカル $\text{OH}\cdot$)を生成する。

【0061】

(4) $\text{H}_2\text{O}_2/\text{ROS}$ は、非特異的ストレスおよび局所組織における炎症応答を生じる。この応答において、ミクログリアおよびおそらくニューロンから放出される神経化学物質は、 Zn(II) 、 Cu(II) および可溶性 $\text{A}\beta$ である。家族性ADは、 $\text{A}\beta$ がこの時点で放出される見込みを増加する。局所的アシドーシスはまた、ストレス/炎症応答の一部である。これらの因子を組み合わせ、 $\text{A}\beta$ 沈殿および蓄積を形成し、おそらくその結果、これらの因子が、可逆的重合を誘導するので、スーパーオキシドスカベンジャーとしてインサイチュで機能し得る。それ故、より可溶性の $\text{A}\beta$ 種が、蓄積斑沈着物の外辺部を装飾(decorate)する。

【0062】

(5) $\text{A}\beta$ が、 $\text{OH}\cdot$ と遭遇する場合、 $\text{A}\beta$ は、オリゴマー形成プロセスの間に共有結合し、再可溶化がより困難な蓄積物を形成し、そして斑アミロイドに特徴的なSDS耐性オリゴマーの形成を導く。

【0063】

(6) $\text{A}\beta$ の濃度が、酸化ストレスの領域に近接して上昇する場合、 H_2O_2 の局所濃度もまた上昇するようである。 H_2O_2 の濃度が、 $\text{A}\beta$ に近接して非常に高くなる場合、次いで、SOD1のように(Uchida, K. およびKawakishi, S., J. Biol. Chem. 269:2405-2410 (1994); Atwood, C. S., ら, Soc. Neurosci. Abstr. 23:1883 (1997))、 $\text{A}\beta$ は、Fenton様化学による直接的または間接的な H_2O_2 媒介性酸化によって損傷を受ける。次いで、損傷を受けたペプチドが蓄積し得、よりさらに局所性 H_2O_2 濃度を上昇し、抗酸化剤応答として、より多くの $\text{A}\beta$ の放出を誘発し、悪性のサイクルを導く(Frederikse, P. H. ら, J. Biol. Chem. 271:10169-10174 (1996))。損傷を受けた $\text{A}\beta$ の蓄積は、酸素からの過酸化水素の不適切な生成を維持する。 $\text{A}\beta$ 沈着物の蓄積による豊富な遊離のラジカルの生成は、多くの系および化合物(金属調節タンパク質が挙げられるが、これに限定されない)を

さらに損傷し得、従って、問題をいっそうひどくする。それ故、 $A\beta$ 沈着物は、スーパーオキシドにおいて低い、 H_2O_2 においては高い、混成の環境であり得る。それ故、 $A\beta$ および特に $A\beta_{1-42}$ は、迅速な応答の Cu/Zn スーパーオキシドスカベンジャーとして役立ち得、これは、 $SOD1$ のように、その環境によって崩壊されるようになり得、ニューロンの死を導く。

【0064】

重要なことに、 $A\beta$ のレドックス活性は、ペプチドの沈殿によって減弱されない。これは、インビボで、 $A\beta$ 沈着物が、永続する基底上にインサイチュで ROS を生成し得ることを示唆する。これは、 AD に罹患した脳における酸化ストレスの主要な源が、アミロイド沈着であり、この沈着は、脳の環境における生体金属 (*biometal*) ホメオスタシス機構に対する損傷によって引き起こされ得、そして順に、この損傷によっていっそう大きくされ得ることを示唆する。従って、 AD の脳における $A\beta$ の蓄積は、凝集物中の $SOD1$ の蓄積が、家族性筋萎縮性側索硬化症における運動ニューロンを損傷し得る様式と同様に、酸化ストレスに寄与するようである (Brujin, L. I., *ら*, *Neuron* 18 : 327-338 (1997))。

【0065】

$A\beta_{1-42}$ は、 $A\beta_{1-40}$ よりもスーパーオキシドについてより貪欲なスカベンジャーであるようであるので、本発明者らは、より大きな比率の $A\beta_{1-42}$ の放出が、より過酷な酸化ストレスに対する生理学的応答 (例えば、アポトーシス) を反映し得ることを予測する。 $Cu(I)$ を結合する場合、より多くの量の還元された金属および ROS が、 $A\beta_{1-40}$ よりも $A\beta_{1-42}$ によって生成されるという事実は、 $A\beta_{1-42}$ が $Cu(I)$ について有する、より高い結合親和性を反映する (11)。興味深いことに、プレセニリンにおける家族性 AD 変異は、アポトーシスおよび増大した $A\beta_{1-42}$ 放出の両方に関連する (Wolozin, B., *ら*, *Science* 274 : 1710-1713 (1996))。これは、増大した $A\beta_{1-42}$ 生成 (例えば、プレセニリン変異が原因で) は、おそらく有害な長期の結果 (分子アンタゴニスト多面発現性の可能性のある例) を伴う生存応答であるという興味深い可能性を高める。しかし、 $A\beta$ の両方の種は、実施例3に記

載されるように、SOD1を模倣する能力を有する。

【0066】

A β は、神経変性疾患と関連して蓄積する、スーパーオキシドジスムターゼ活性を有する銅結合タンパク質のように、SOD1 (Bruijn, L. I. ら、Neuron 18 (2) : 327-38 (1997)) およびPrP (Brown, D. , ら、Proceedings of International Society for Neurochemistry, Annual Meeting, Berlin 1999; Brown, D. R. , ら、Biochem. J. 344 : 1-5 (1999)) を結合する。CuおよびZnのホメオスタシスは、AD脳において調節不全である (Huang, X. , ら、J. Biol. Chem. 272 : 26464-26470 (1997) ; Atwood, C. S. , ら、Journal of Biological Chemistry 273 : 12817-12826 (1998))。そして、CuおよびZnのレベルは、AD脳実質において顕著に上昇する (Lovell, M. A. , ら、J. Neurol. Sci. 158 (1) : 47-52 (1998))。A β のジスムターゼ活性が、CuおよびZnによって決定されるので、CuまたはZnの異常なホメオスタシスが、ADにおけるA β の機能および凝集の両方に悪影響を与え得る (Bush, A. I. , ら、J. Biol. Chem. 269 : 12152-12158 (1994) ; Bush, A. I. , ら、Science 265 : 1464-1467 (1994) ; Huang, X. , ら、J. Biol. Chem. 272 : 26464-26470 (1997) ; Atwood, C. S. , ら、Journal of Biological Chemistry 273 : 12817-12826 (1998))。

【0067】

(金属イオンおよびA β 沈着)

脳は、Zn (II) (約150 μ M; Frederickson, C. J. International Review of Neurobiology 31 : 145-237 (1989)) およびCu (II) (約100 μ M; Warren, P. J. , ら、Brain 83 : 709-717 (1960)) ; O

wen, C. A., *Physiological Aspects of Copper*, Noyes Publications, Park Ridge, New Jersey (1982), 160-191頁)の両方を高いレベルで含む。Zn(II)およびCu(II)の細胞内濃度は、細胞外濃度よりも、それぞれ約1000倍および約100倍高い。細胞内濃度と細胞外濃度との間のこの大きな勾配は、高いエネルギー依存機構が、ニューロン内でこれらの金属を封鎖するために必要とされることを示唆する。従って、エネルギー代謝の変化または損傷は、これらの金属イオンの取り込みに影響を及ぼし得、細胞外空間へのこれらの放出を促進し得、そして減少したpHの相互作用的效果とともに、膜結合A β を促進して凝集し得る。

【0068】

A β は、同時に、等モル濃度で銅および亜鉛を結合する。しかし、Cu(II)についてのA β_{1-42} の親和性は、Cu(II)についてのA β_{1-40} の親和性($1.5-2.0 \times 10^{-10}M$)よりもいっそう高い($2.0 \times 10^{-17}M$)が、Zn(II)についてのペプチドの親和性は類似する(Atwood, C. S., ら, *Soc. Neurosci. Abstr.* 23:1883(1997); 未発表の知見)。A β が、銅イオンおよび亜鉛イオンについてこのような高い親和性を有するという事実は、細胞外金属イオンの濃度におけるわずかな変化に応答するように進化したことを示唆する。これは、Cuの存在下での凝集が、脳のpHであるpH7.1で約30%である(Yates C. M., ら, *J. Neurochem.* 55:1624-1630(1990))が、pH6.8で85%であるという事実によって支持される。まとめると、この結果は、A β が、炎症または細胞損傷に対する局所的に媒介された応答の一部として、神経損傷と関連した生化学的変化に対して応答するように進化し得ることを示す。従って、Cu(II)媒介性A β 結合および凝集が、温和な酸性環境に対する意図的な細胞応答であり得る可能性がある。

【0069】

さらに、減少した大脳のpHは、老化の合併症であり(Yates CM, ら, *J. Neurochem.* 55:1624-1630(1990)、これは、

CuおよびZn媒介性A β 凝集が、温和なアシドーシスの環境に対する正常な細胞応答であり得ることをさらに示す。しかし、より低い大脳のpHの環境へのA β の長期間の曝露は、遊離の金属イオンおよび反応性酸素種の濃度上昇、ならびに不可逆性A β オリゴマーの形成を促進する時間に渡る、A β ₁₋₄₂の不適切な作用、およびADにおけるアミロイドとしてのその引き続く沈着を促進し得る。しかし、このpH媒介性Cu(II)凝集の可逆性は、治療的介入の可能性を提示する。

【0070】

A β が、H₂O₂およびCu(I)を生成し得、これらの両方が、神経毒性効果に関連するという発見は、A β ポリマーの神経毒性についての説明を提供する。これらの知見は、蓄積した可溶性A β によって生成されるCu(I)およびROSの濃度を変化させる因子を制御することによって、A β ポリマーの神経毒性を減少する可能性があり得ることを示唆する。亜鉛、銅およびpHのような因子の操作が、A β による変化したCu(I)およびH₂O₂の生成を生じ得ることが発見された。従って、脳間隙におけるpHならびに亜鉛および銅のレベルの調整に有用であるとして同定された薬剤が使用されて、Cu(I)およびH₂O₂の濃度を調整し得、従って、神経毒性負担を減少し得、それ故、アルツハイマー病を処置し得る。

【0071】

(アルツハイマー病を処置するために使用され得る薬剤を同定するためのスクリーニングアッセイ)

要約すると、以下のことが最近発見された (i) ADに罹患した脳における大量のA β 凝集が亜鉛および銅と結合していること、(ii) A β ペプチドは、SOD1の酸化還元活性と類似のFe/Cu依存的酸化還元活性を示すこと、(iii) A β ₁₋₄₂は、とりわけ酸化還元的に反応性であり、そしてO₂をH₂O₂に還元する異常な特性を有すること、(iv) A β 酸化還元反応性の調節解除は、ペプチドが重合することを引き起こすこと、および(v) A β が有益な抗酸化特性を有すること。これらの反応は、ADの病原性事象に関係するので、これらは、治療薬剤設計のための有望な標的を提供する。従って、ADおよび/またはそ

の症状の処置および／または予防において有用な薬剤には、以下が含まれる：

- (a) $A\beta$ によって生成される $Cu(I)$ または $Fe(II)$ の量を減少させる薬剤；
- (b) $A\beta$ による過酸化水素の生成を促進または阻害する薬剤；
- (c) $OH\cdot$ の生成を阻害する薬剤；および／または
- (d) 抗酸化剤として機能する $A\beta$ の能力を阻害しない薬剤。

【0072】

$A\beta$ の凝集および架橋がその神経毒性に寄与するので、上記に列挙される少なくとも1つの活性を有すると同定された薬剤もまた、薬剤が $A\beta$ によるオリゴマー化を阻害し得るか否かを決定するための試験に供され得る。このような薬剤はまた、可溶性 $A\beta$ と架橋した $A\beta$ との両方の神経毒性を減少するその能力について試験され得る。

【0073】

$A\beta$ が O_2^- から H_2O_2 を生成する能力は、多くの例において、有益であり得るので、本発明は、 AD および／またはその症状の処置および／または予防において使用されるこのプロセスを阻害しない薬剤を同定するための方法に関する。従って、本発明の1つの局面において、薬剤を同定するための方法は、2つの工程を包含する。第1の工程において、候補薬剤の、溶存酸素依存的過酸化水素形成および引き続く ROS 生成を妨害する能力が評価される。薬剤が「プロ酸化剤」活性を中断し得るならば、その薬剤は、第2の工程に供せられ、ここで、薬剤の、抗酸化剤を阻害しない能力、すなわち、 SOD 様の $A\beta$ 活性が評価される、薬剤がこのような抗酸化剤を阻害しないならば、その薬剤は、 AD および／またはその症状の処置および／または予防において有用であり得る。

【0074】

従って、本発明の方法は以下を包含する：

- (a) $A\beta$ 含有サンプルに薬剤を添加する工程；
- (b) 溶解酸素依存性過酸化水素形成を上記薬剤が阻害し得るか否かを決定する工程；および
- (c) スーパーオキシド依存性過酸化水素形成を上記薬剤が阻害し得ないか否

かを決定する工程。

【0075】

好ましい実施形態において、薬剤が $A\beta$ のSOD様活性を変化させる能力の決定は、 $A\beta$ が $Cu(I)$ 、 $Fe(II)$ 、または H_2O_2 を触媒的に生成し得るか否かを決定することによってなされる。本願中の別の箇所に開示される方法に加えて、 $A\beta$ が $Cu(I)$ 、 $Fe(II)$ 、または H_2O_2 を触媒的に生成し得るか否かを決定するための方法は、当業者に周知である。特に、 H_2O_2 の触媒的生成は、レーザー閃光光分解、パルス放射線分解、またはNBTアッセイ(G. PetersおよびM. A. J. Rodgers, Biochim. Biophys. Acta. 637: 43-52 (1981))を用いることによって決定され得る。

【0076】

別の局面において、本発明は、ADおよび／またはその症状の処置および／または予防において使用される薬剤の同定のための方法に関し、ここでその薬剤は、 $A\beta$ による $Cu(I)$ の生成を変化させ得、そして好ましくは減少させ得、上記方法は、以下：

- (a) 第1の $A\beta$ サンプルに $Cu(II)$ を添加する工程；
 - (b) $Cu(I)$ が生成するに十分な時間、上記第1のサンプルをインキュベートする工程；
 - (c) 第2の $A\beta$ サンプルに $Cu(II)$ を添加する工程であって、上記第2のサンプルがさらに候補薬物を含む、工程；
 - (d) 上記第1のサンプルと同じ時間、上記第2のサンプルをインキュベートする工程；
 - (e) 上記第1のサンプルおよび上記第2のサンプルにより生成される $Cu(I)$ の量を決定する工程；ならびに
 - (f) 上記第1のサンプルにより生成される $Cu(I)$ の量を、上記第2のサンプルにより生成される $Cu(I)$ の量と比較する工程、を包含し、
- それにより上記第2のサンプルと比較した上記第1のサンプルにより生成される $Cu(I)$ の量の差異が、上記候補薬物が $A\beta$ による $Cu(I)$ の生成を変化

させたことを示す、方法である。当然、第2のA β サンプル中のCu(I)の量が、第1のA β サンプル中のCu(I)の量よりも少ない場合には、これは、その薬剤がCu(I)生成を減少させたことを示す。

【0077】

好ましい実施形態において、存在するCu(I)の量は、分光測定的方法を用いて決定される。例えば、上記第1のサンプルおよび上記第2のサンプルに存在するCu(I)の量は、

(a) 上記第1のサンプルおよび上記第2のサンプルに錯化剤を添加する工程であって、上記錯化剤がCu(I)と結合して錯化合物を形成し得、上記錯化合物が最適な可視吸収波長を有する、工程；

(b) 上記第1のサンプルの吸光率および上記第2のサンプルの吸光率を測定する工程；ならびに

(c) 上記第1のサンプルおよび上記第2のサンプル中のCu(I)の濃度を、(b)で得た吸光率を使用して算出する工程、
によって決定される。

【0078】

好ましい実施形態において、上記錯化剤は、バトクプロインニルスルホン酸(bathocuproinedisulfonic)(BC)アニオンである。実施例2を参照のこと。次いで、A β によって生成されるCu(I)の濃度は、約478nm~約488nm、より好ましくは、約480nm~約486nm、および最も好ましくは、約483nmのサンプルの吸光率に基づいて計算され得る。A β は、反応混合物へのCu(II)の添加のほぼ直後にH₂O₂およびCu(I)を生成するので、BCは、Cu(II)の添加直後に反応物に添加され得る。サンプル中で達成されるBCの濃度は、約10 μ Mと約400 μ Mとの間であり、より好ましくは、約75 μ Mと約300 μ Mとの間、およびなおより好ましくは、約150 μ Mと約275 μ Mとの間である。最も好ましい実施形態において、サンプル中で達成されるBCの濃度は、約200 μ Mである。当然、当業者は、添加されるBCの濃度を容易に最適化し得、これは慣用的な実験に過ぎない。

【0079】

好ましい実施形態において、上記の方法は、マイクロタイタープレート中で実行され得、そしてプレートリーダーによって吸光率測定が実行され、従って、多数の候補薬学的化合物が同時に試験され得ることを可能にする。

【0080】

別の局面において、本発明は、ADおよび／またはその症状の処置および／または予防において使用される薬剤の同定のための方法に関し、ここで、上記薬剤は、AβによるFe(II)の生成を変化させ得、そして好ましくは、それを減少させ得る。この方法は、以下：

- (a) 第1のAβサンプルにFe(III)を添加する工程；
 - (b) Fe(II)が生成するに十分な時間、上記第1のサンプルをインキュベートする工程；
 - (c) 第2のAβサンプルにFe(III)を添加する工程であって、上記第2のサンプルがさらに候補薬物を含む、工程；
 - (d) 上記第1のサンプルと同じ時間、上記第2のサンプルをインキュベートする工程；
 - (e) 上記第1のサンプルおよび上記第2のサンプルにより生成されるFe(II)の量を決定する工程；ならびに
 - (f) 上記第1のサンプル中に存在するFe(II)の量を上記第2のサンプル中に存在するFe(II)の量と比較する工程、を包含し、
- それによって上記第2のサンプルと比較した上記第1のサンプル中に存在するFe(II)の量の差異が、上記候補薬物がAβによるFe(II)の生成を変化させたことを示す。当然、Fe(II)の量は、第1のサンプル中よりも第2のサンプル中で低く、このことは、この薬剤が、Fe(II)生成を減少させたことを示す。

【0081】

Fe(II)は、Linertら、Biochim. Biophys. Acta 1316:160-168(1996)の分光測定法を用いて決定され得る。他のこのような方法は、当業者に容易に明らかである。

【0082】

好ましい実施形態において、存在する $\text{Fe}(\text{II})$ の量は、上記の $\text{Cu}(\text{I})$ の決定のために使用される方法に類似の分光測定法を用いて決定され得る。好ましい錯化剤は、バトフェナントロリンニスルホン酸(bathophenanthroline disulfonic) (BP) アニオンである。次いで、 $\text{A}\beta$ によって生成される $\text{Fe}(\text{II})$ -BPの濃度は、約530nm~約540nm、より好ましくは、約533nm~約538nm、および最も好ましくは、約535nmのサンプルの吸光率に基づいて計算され得る。実施例2を参照のこと。 $\text{A}\beta$ は、反応混合物への $\text{Fe}(\text{III})$ の添加のほぼ直後に H_2O_2 および $\text{Fe}(\text{II})$ を生成するので、BPは、 $\text{Fe}(\text{III})$ の添加直後に反応物に添加され得る。サンプル中で達成されるBCの濃度は、約10 μM と約400 μM の間であり、より好ましくは、約75 μM と約300 μM の間、およびなおより好ましくは、約150 μM と約275 μM の間である。最も好ましい実施形態において、サンプル中で達成されるBPの濃度は、約200 μM である。当然、当業者は、添加されるBPの濃度を容易に最適化し得、これは慣用的な実験に過ぎない。

【0083】

好ましい実施形態において、上記の方法は、マイクロタイタープレート中で実行され得、そしてプレートリーダーによって吸光率測定が実行され、従って、多くの候補薬学的化合物が同時に試験されることを可能にする。

【0084】

なお別の局面において、本発明は、ADおよび/またはその症状の処置および/または予防において使用される薬剤の同定のための方法に関し、ここで、上記薬剤は、 $\text{A}\beta$ による H_2O_2 の生成を変化させ得る。この方法は、以下：

- (a) 第1の $\text{A}\beta$ サンプルに $\text{Cu}(\text{II})$ または $\text{Fe}(\text{III})$ を添加する工程；
- (b) H_2O_2 が生成するに十分な時間、上記第1のサンプルをインキュベートする工程；
- (c) 第2の $\text{A}\beta$ サンプルに $\text{Cu}(\text{II})$ または $\text{Fe}(\text{III})$ を添加する工

程であって、上記第2のサンプルがさらに候補薬物を含む、工程；

(d) 上記第1のサンプルと同じ時間、上記第2のサンプルをインキュベートする工程；

(e) 上記第1のサンプルおよび上記第2のサンプルにより生成される H_2O_2 の量を決定する工程；ならびに

(f) 上記第1のサンプル中に存在する H_2O_2 の量を上記第2のサンプル中に存在する H_2O_2 の量と比較する工程を包含し、

それにより、上記第2のサンプルと比較した上記第1のサンプル中に存在する H_2O_2 の量の差異が、上記候補薬物が $A\beta$ による H_2O_2 の生成を変化させたことを示す、方法である。当業者によって理解されるように、この方法は、生成された H_2O_2 の量を減少させる薬剤を検出するために使用され得る（この場合において、 H_2O_2 の量は、第1のサンプル中よりも第2のサンプル中で少ない）。

【0085】

生成される H_2O_2 の量は、例えば、PeroxOquant Quantitative Peroxide Assay (Pierce, Rockford, IL) を用いて決定され得る。

【0086】

好ましい実施形態において、上記第1のサンプルおよび上記第2のサンプル中に存在する H_2O_2 の量の決定は、以下の工程を包含する方法によって決定される；

(a) 上記第1のサンプルの第1のアリコートに、上記サンプルにより生成される H_2O_2 を分解するに十分な量でカタラーゼを添加する工程；

(b) TCEPを、

(i) 上記第1のサンプルの第1のアリコート；

(ii) 上記第1のサンプルの第2のアリコート；および

(iii) 上記第2のサンプル

に添加する工程；

(c) (b) で得たサンプルを、上記TCEPが上記 H_2O_2 のすべてを捕捉するに十分な時間、インキュベートする工程；

- (d) (c) で得たサンプルにDTNBを添加する工程；
- (e) (d) で得たサンプルを、TMBが生成するに十分な時間、インキュベートする工程；
- (f) (e) で得たサンプルの吸光率を測定する工程；ならびに
- (g) 上記第1のサンプルおよび上記第2のサンプル中の H_2O_2 の濃度を、(f) で得た吸光率を使用して算出する工程。

【0087】

好ましい実施形態において、TMBの吸光率は、約407～約417nmで測定される。より好ましい実施形態において、その吸光率は、約412nmで測定される。

【0088】

好ましい実施形態において、上記の方法は、マイクロタイタープレート中で実行され得、そしてプレートリーダーによって吸光率測定が実行され、従って、大量の候補薬剤が同時にスクリーニングされ得ることを可能にする。

【0089】

別の局面において、本発明は、ADおよび／またはその症状の処置および／または予防において使用され得る薬剤の同定のための方法に関し、ここで、上記薬剤は、酸化還元反応性金属媒介性A β 架橋を阻害し得る。この方法は、以下：

- (a) 第1のA β サンプルに酸化還元反応性金属を添加する工程；
- (b) A β 架橋を可能にするに十分な時間、上記第1のサンプルをインキュベートする工程；
- (c) 第2のA β サンプルに上記酸化還元反応性金属を添加する工程であって、上記第2のサンプルがさらに候補薬物を含む、工程；
- (d) 上記第1のサンプルと同じ時間、上記第2のサンプルをインキュベートする工程；
- (e) 上記第1のサンプルおよび上記第2のサンプルの各々からアリコートを取り出す工程；ならびに
- (f) 上記第1のサンプルおよび上記第2のサンプル中の架橋の存在または非存在を決定する工程、を包含し、

それにより上記第1のサンプルと比較した上記第2のサンプル中のA β 架橋の非存在が、上記候補薬物がA β 架橋を阻害したことを示す、方法である。

【0090】

好ましい実施形態では、工程(f)において、上記第1のサンプルおよび上記第2のサンプル中の架橋の存在および非存在を決定するために、ウェスタンブロット分析が実行される。

【0091】

上記の6種類のアッセイは、ADおよび/またはその症状を処置および/または予防するために有用な薬剤を効果的に同定するために、任意の順番および組み合わせで実施され得る。

【0092】

別の局面において、1以上の上記のスクリーニングアッセイによって同定された候補薬剤は、その薬剤が細胞培養中のA β 媒介毒性を変化させ得、そして好ましくは、減少または除去され得るか否かを決定するために、さらなるスクリーニングを受け得る。このようなアッセイには、MTTアッセイが含まれるがこれに限定されない。このアッセイは、有色のホルマゾン(formazon)への3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT)の還元を測定する(Hansenら、1989)。代替物は除外されない(Burdonら、1993)が、MTT還元の主要な部位は、2つの電子伝達の段階、ミトコンドリアのシトクロムオキシダーゼおよびユビキノンであると考えられている(Slaterら、1963)。

【0093】

代替的なアッセイは、細胞からの乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の放出を測定し、この測定は、培養されたCNS細胞中の細胞毒性を定量するために慣用的に使用される(Choi、1987)。MTT測定は、主として、電子伝達鎖の完全性を反映する細胞内の初期の酸化還元変化を測定するが、LDHの放出は、細胞溶解を通してであると考えられている。第3のアッセイは、トリパンブルー排除を伴う目視の計数を指向する。神経毒性についての他の市販のアッセイ(Live/Dead Euko Light Viability/Cytoto

xicity Assay (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) を含む) もまた、Cu (I)、Fe (II)、H₂O₂、OH[•]、およびO₂⁻生成を変化させるか、または銅によって誘導される、pH依存性凝集、およびAβの架橋を変化させる候補化合物がまた、Aβの神経毒性を減少させ得るか否かを決定するために使用され得る。神経毒性アッセイにおいて使用され得る細胞型には、癌細胞および初代細胞（例えば、ラット初代前頭ニューロン細胞）が含まれるがこれらに限定されない。

【0094】

従って、本発明はさらに、ADおよび／またはその症状の処置および／または予防において使用され得る薬剤を同定するための方法に関し、ここで、上記薬剤は、Aβの毒性を減少させ得、この方法は以下：

(a) 第1の細胞培養物にAβを添加する工程；

(b) 第2の細胞培養物にAβを添加する工程であって、上記第2の細胞培養物がさらに候補薬物を含む、工程；

(c) 上記第1のサンプルおよび上記第2のサンプル中のAβの神経毒性のレベルを決定する工程；ならびに

(d) 上記第1のサンプルのAβの神経毒性のレベルおよび上記第2のサンプル中のAβの神経毒性のレベルを比較する工程を包含し、

それにより、上記第1のサンプルと比較して上記第2のサンプル中の低い神経毒性レベルが、上記候補薬物がAβの神経毒性を減少させたこと、およびそれによりADおよび／またはその症状を処置および／または予防するために使用され得ることを示す、方法である。

【0095】

上記の方法のいずれかにおいて試験される候補薬剤は、広範にわたる。このような薬剤には、Aβとの相互作用について亜鉛または銅の利用可能性を改変する薬剤（例えば、デスフェリオキサミンのようなキレート剤）、ならびに、遊離の亜鉛に結合し、そして血液脳関門（BBB）を横切る血漿からの亜鉛の輸送に関与すると考えられている、ヒスチジンおよびシステインのようなアミノ酸が含まれるがこれらに限定されない。これらの薬剤には、特異的な亜鉛キレート剤のす

すべてのクラス、およびEDTA（エデト酸、N, N' - 1, 2-エタンジイルビス（N-（カルボキシメチル）グリシン）または（エチレンジニトロ）四酢酸、Merck Index、第10版のエントリー3490）およびすべてのEDTAの塩、ならびに／またはフィチン酸（ミオーイノシトールヘキサキス（リン酸二水素）、Merck Index、第10版のエントリー7269）のような、亜鉛をキレートし得る非特異的なキレート）、ならびにフィチン酸塩の組み合わせが含まれるがこれらに限定されない。このクラスにおける好ましい候補薬剤には、バトクプロイン（bathocuproine）およびバトフェナントロリン（bathophenanthroline）が含まれる。さらなる薬剤には、色素化合物、ヘパリン、ヘパラン硫酸、および抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、トロロックス（trolox）、およびトコフェロール）のような、脳へのアクセスを有し得る化合物が含まれるがこれらに限定されない。

【0096】

種々の反応混合物のpHが、好ましくは中性に近い。従って、そのpHは、約6.6～約8まで、好ましくは、約6.6～約7.8までの範囲にわたる。最も好ましいpHは、約7.4である。

【0097】

本発明は、約25℃～約40℃の範囲にわたる温度で実施され得る。好ましい温度は、約30℃～約40℃である。本発明の実施のために最も好ましい温度は、約37℃（すなわち、ヒトの体温）である。

【0098】

本発明の方法において使用され得る緩衝液には、Tris-塩酸、Trisベース、MOPS、HEPES、バイカーボネート、クレブス液、およびタイロード液が含まれるがこれらに限定されない。緩衝液の濃度は、約10mMと約500mMとの間である。本発明の方法において含まれるアッセイの性質に起因して、緩衝液を選択する場合には、所定の緩衝液中の自発的なフリーラジカル生成が、反応を妨害し得ることを心に留めなければならない。この理由によって、PBSは、本発明の方法における使用のための好ましい緩衝液であるが、他の緩衝液は、適切な制御が上述の潜在的なフリーラジカル形成を矯正するために使用され

るという条件下で使用され得る。

【0099】

$\text{Cu}(\text{I})$ は、 $\text{A}\beta$ が $\text{Cu}(\text{I})$ を生成するために反応混合物中に存在しなくてはならない。 $\text{Cu}(\text{I})$ の任意の塩が、この要件を満たすために使用され得る (CuCl_2 、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ などが含まれるがこれらに限定されない)。銅の濃度は、少なくとも約 $1\mu\text{M}$ ~ 約 $50\mu\text{M}$ までの範囲にわたる。好ましくは、約 $10\mu\text{M}$ の銅の濃度が反応混合物中に含まれる。

【0100】

$\text{Fe}(\text{III})$ は、 $\text{A}\beta$ が $\text{Fe}(\text{I})$ を生成するために反応混合物中に存在しなくてはならない。 $\text{Fe}(\text{III})$ の任意の塩が、この要件を満たすために使用され得る (FeCl_3 などが含まれるがこれらに限定されない)。鉄の濃度は、少なくとも約 $1\mu\text{M}$ ~ 約 $50\mu\text{M}$ までの範囲にわたる。好ましくは、約 $10\mu\text{M}$ の鉄の濃度が反応混合物中に含まれる。

【0101】

酸化還元活性金属 (redox active metal) (例えば、 $\text{Cu}(\text{I})$ または $\text{Fe}(\text{III})$) は、 $\text{A}\beta$ が触媒的に H_2O_2 を生成するために反応混合物中に存在しなくてはならない。 $\text{Cu}(\text{I})$ の任意の塩が、この要件を満たすために使用され得る (CuCl_2 、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ などが含まれるがこれらに限定されない)。同様に、 $\text{Fe}(\text{III})$ の任意の塩が、本発明に従って使用され得る (例えば、 FeCl_3)。銅および鉄の濃度は、少なくとも約 $1\mu\text{M}$ ~ 約 $50\mu\text{M}$ までの範囲にわたる。好ましくは、約 $10\mu\text{M}$ の銅および鉄の濃度が反応混合物中に含まれる。

【0102】

$\text{A}\beta$ による $\text{Cu}(\text{I})$ および H_2O_2 の生成は、ほぼ瞬間速度で生じる。従って、生じた $\text{Cu}(\text{I})$ または H_2O_2 の濃度の測定は、 $\text{A}\beta$ に対する $\text{Cu}(\text{I})$ の添加の実質的直後に行われ得る。

【0103】

同様に、 $\text{A}\beta$ は、反応混合物に $\text{Fe}(\text{III})$ 、および必要に応じて $\text{Zn}(\text{I})$ を添加したほぼ直後に H_2O_2 および $\text{Fe}(\text{I})$ を生成する。従って、生成

した $\text{Fe}(\text{I I})$ または H_2O_2 の濃度の測定は、 $\text{AB} \rightarrow \text{Fe}(\text{I I I})$ を添加した実質的に直後に行われ得る。しかし、所望であれば、この反応は、より長期間続けさせられ得る。本発明の代替的实施形態において、この反応を約30分間行う。

【0104】

本発明はまた、生物学的流体（例えば、CSFのような生物学的流体）の存在下で行われて、実際の生理学的状態が綿密に模倣され得る。当然のように、このような流体は、既にABを含み、従って、本発明の方法がCSFのような生物学的流体を用いて行われるべき場合、サンプルにABを添加する必要は必ずしもない。この生物学的流体は、直接使用され得るか、または約1:1,000～約1:5の割合で希釈され得る。

【0105】

本発明のアッセイの各々は、理想的には、キットの調製に適切である。このようなキットは、1つ以上の入れ物手段（例えば、バイアル、チューブなど）を厳重に拘束して受け入れるために区画化された容器手段を含み得る。入れ物手段の各々は、この方法において使用されるアッセイの別個の元素のうちの1つを含む。例えば、本発明の方法において使用される種々の濃度の試薬を含むさらなる容器手段に加えて、任意の形態で（すなわち、溶液または乾燥形態で、可溶性または不溶性形態で）ABペプチドの標準的溶液または凍結乾燥したABペプチドを含む入れ物手段、および標準溶液または種々の量の酸化還元活性金属（例えば、 $\text{Cu}(\text{I I})$ または $\text{Fe}(\text{I I I})$)の塩を含む入れ物手段が提供され得る。例えば、実施例2に記載されるように、 $\text{Cu}(\text{I})$ または $\text{Fe}(\text{I I})$ の決定のために使用される溶液は、それぞれ、CBアニオンおよびBPアニオンを含み得る。同様に、実施例2に記載されるように H_2O_2 の決定のために使用される溶液は、TCEPおよびDTNB、ならびにカタラーゼ（約10U/ml）を含み得る。ABペプチドの標準溶液は、好ましくは、約10 μM を超える濃度、好ましくは約10～約25 μM の濃度を有するか、またはこのペプチドがその凍結乾燥形態で提供される場合は、その凍結乾燥形態に水性緩衝液または生理学的溶液を添加することによりこれらの濃度に可溶化され得る量で提供され得る。分

析物の標準溶液は、本発明の方法に従う比較のために、コントロール混合物および試験反応混合物を調製するために使用され得る。

【0106】

(アルツハイマー病および／またはその症状の処置)

上記のスクリーニングアッセイのいずれか1つまたはその組合わせにより同定された薬剤は、この薬剤の有効なレベルを送達する任意の経路により投与されて（例えば、注射、注入、経口、鼻腔内、非経口的、静脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、直腸に、移植により、経皮的、徐放により、口内、または大脳内）、ADおよび／またはその症状の程度および重篤度を低減し得る。言い換えると、この薬剤は、任意の適切な物理的方法を用いて治療的に有効な量で投与される。非経口的投与については、薬剤を含む調製物は、生理学的に受容可能なキャリア（例えば、塩類、緩衝液、または薬学的に受容可能な滅菌水性溶媒または非水性溶媒、懸濁液、分散媒体またはエマルジョン）とともに、このような処置を必要とする患者に提供され得る。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油）、および注射可能な有機エステル（例えば、オレイン酸エチル）である。水性キャリアとしては、水、生理食塩水、水-アルコール溶液、リンゲルデキストロース溶液、デキストロースおよび塩化ナトリウムの溶液、ラクトースを含むリンゲル液、および不揮発性油が挙げられる。含まれ得る他の成分は、組成物の有効性を改善するものである。キャリアまたは閉鎖包帯を用いて、皮膚透過性を増大し、そして抗原吸収を増強させ得る。薬学的組成物を調製する際に使用するために適切な材料の例は、多くの情報源において提供される（Remington's Pharmaceutical Sciences, Osol, A., 編, 第18版, 1990, Mack Publishing Co., Easton, PAを含む）。

【0107】

注射に関しては、滅菌水溶液（ここでは水溶性）が一般に使用され、あるいは、滅菌注射可能溶液の用時調製のための滅菌粉剤が使用され得る。薬学的組成物は製造および貯蔵条件下で安定でなければならず、そして細菌および真菌のような微生物の汚染活動に対して保護されなければならない。微生物の活動を防止す

ることは、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなど）によりもたらされ得る。多くの場合、等張剤（例えば、糖類または塩化ナトリウム）を含むことが好ましい。注射可能な組成物の長期化した吸収は、吸収を遅延させる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）を組成物中で使用することによりもたらされ得る。

【0108】

滅菌注射可能溶液は、必要時に、種々の上記に列挙した他の成分とともに、適切な溶媒中に必要な量の薬剤を組み込み、続いて滅菌する（例えば、濾過または照射する）ことにより調製される。

【0109】

滅菌注射可能溶液を調製するための滅菌粉剤の場合は、好ましい調製方法は、活性薬剤および任意のさらなる所望の成分を、その予め濾過滅菌した溶液から粉剤を得る真空乾燥および凍結乾燥技術である。

【0110】

活性薬剤が適切に保護される場合、それらは、例えば、不活性希釈剤または同化性の食用キャリアを用いて経口投与され得るか、または硬質または軟質ゼラチンカプセル剤中に封じ込められ得るか、錠剤に圧縮され得るか、または食物中の食品に直接組み込まれ得る。経口治療投与に関しては、活性薬剤は、賦形剤とともに組み込まれ得、そして摂取可能な錠剤、口内錠剤、トローチ、カプセル剤、エリキシル、懸濁液、シロップ、カシェ剤などの形態で使用され得る。このような組成物および調製物は、スクリーニングアッセイにおいて同定された少なくとも約1重量%の薬剤を含む。組成物および調製物の割合は、もちろん変化し得、そして便宜的には、重量単位の約5%～約80%であり得る。この活性薬剤は、適切な薬学的に受容可能なキャリアとともに投薬単位形態で有効量で簡便かつ効率的投与のために調合され得る。この投薬量は、例えば、患者の年齢、健康状態および体重、使用される投薬量、同時に行っている処置（もしあれば）、所望の効果、および使用される特定の薬剤のような因子に依存する。投薬および薬物の投与に関するさらなる情報は、多くの情報源（Remington's Pha

rmaceutical Sciences, Osol, A., 編, 第18版, 1990, Mack Publishing Co., Easton, PAを含む) において見出され得る。種々の組成物の投薬量は、薬物の相対的インビボ有効性およびわずかな慣用的実験法を用いてバイオアベイラビリティを比較することにより改変され得る。

【0111】

本明細書中に記載の投薬単位形態は、処置される哺乳動物被験体についての単位投薬量として適切な生理学的に別個の単位をいう；各単位は、必要な薬学的キャリアとともに所望の治療効果を生成するために計算された活性物質の所定の量を含む。本発明の新規な投薬単位形態についての詳述は、(a) 活性薬剤の固有の特徴および達成される特定の治療効果、ならびに (b) 本明細書中で詳細に開示されるように、身体健康状態を損なった疾患状態を有する生物被験体における疾患の処置についてのこのような活性物質を調合する技術における固有の制限により必然的に決定され、かつこれらに直接依存する。

【0112】

錠剤、トローチ、丸剤、カプセル剤などはまた、本明細書中で以下に列挙されるような他の成分を含み得る；ゴム、アラビアガム、コーンスターチまたはゼラチンのような結合剤；リン酸二カルシウムのような賦形剤；コーンスターチ、ジャガイモスターチ、アルギン酸などのような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムのような滑沢剤；およびスクロース、ラクトースまたはサッカリンのような甘味剤；ならびに／またはペパーミント、冬緑油、またはサクランボ風味のような矯味矯臭剤が添加され得る。投薬単位形態がカプセル剤である場合、上記の型の材料に加えて、液体キャリアを含み得る。種々の他の材料がコーティングとして、そうでなければ、投薬単位の物理的形態を改変するために存在し得る。例えば、錠剤、丸剤、またはカプセル剤は、シェラック、糖類またはその両方でコーティングされ得る。シロップまたはエリキシルは、活性薬剤、甘味剤としてスクロース、保存剤としてメチルおよびプロピルパラベン、色素、およびサクランボまたはオレンジ風味のような矯味矯臭剤を含み得る。もちろん、任意の投薬単位形態を調製する際に使用される任意の材料は、実質的に純粋であり、そして使用され

る量で実質的に非毒性であるべきである。さらに、この活性薬剤は、徐放性調製物および処方物に組み込まれ得る。

【0113】

薬学的に受容可能なキャリアおよび／または希釈剤としては、任意のおよび全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤、および吸収遅延剤などが挙げられる。薬学的に活性な物質についてのこのような媒体および薬剤の使用は、当該分野で周知である。任意の従来の媒体または成分が活性薬剤と不適合性である範囲を除いて、治療組成物におけるその使用が意図される。補助活性薬剤はまた、組成物に組み込まれ得る。

【0114】

本発明の薬学的組成物は、本発明のスクリーニングアッセイにより同定された薬剤の有益な効果を経験し得る任意の動物に投与され得る。このような動物の中でも最も重要なものは、本発明をそのように限定することは意図しないが、哺乳動物（例えば、ヒト）である。

【0115】

以下の実施例は、本発明の特定の好ましい実施形態をさらに記載するために例示として提供され、そしてそのように示されない限り、本発明の限定であることを意図しない。

【0116】

(実施例)

(実施例 1 : A β の銅誘導性 pH 依存性凝集)

(材料および方法)

(a) A β ストックの調製)

ヒト A β ₁₋₄₀ ペプチドを合成し、精製し、そして HPLC 分析、アミノ酸分析および W. M. Keck Foundation, Biotechnology Resource Laboratory (Yale University, New Haven, CT) による質量分析により特徴付けた。合成 A β ペプチド溶液をトリフルオロエタノール (ミリQ 水 (Millipore Corporation, Milford, MA) 中 30%) または 20mM HEPES

S (pH 8.5) に、0.5~1.0 g/ml の濃度で溶解し、そして 10,000 g で 20 分間遠心分離した。得られた上清 (ストック $A\beta_{1-40}$) を実験日に、続けて凝集アッセイするために使用した。ストック $A\beta_{1-40}$ の濃度を 214 nm での UV 分光法または Micro BCA タンパク質アッセイ (Pierce, Rockford, IL) により決定した。Micro BCA アッセイを 10 μ l のストック $A\beta_{1-40}$ (またはウシ血清アルブミン標準) を 140 μ l の蒸留水に添加し、次いで、等量の上清 (150 μ l) を 96 ウェルプレートに添加し、そして 562 nm で吸光度を測定することにより行った。アッセイを構成するための標準として、BSA を使用する。 $A\beta_{1-40}$ の濃度を、BSA の標準曲線から決定した。使用前に、全ての緩衝液およびストック溶液の金属イオンを 0.22 μ m フィルター (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) を通して濾過して、任意の特定の物質を除去した。全ての金属イオンは、硝酸鉛以外は塩化物塩であった。

【0117】

(b) 凝集アッセイ

$A\beta_{1-40}$ ストックを、150 mM NaCl および 20 mM グリシン (pH 3~4.5)、mes (pH 5~6.2) または HEPES (pH 6.4~8.8) 中で、金属イオンありまたはなしで 2.5 μ M に希釈し、インキュベートし (30 分間、37°C)、そして遠心分離 (20 分間、10,000 g) した。上清中のタンパク質の量を Micro BCA タンパク質アッセイにより上記のように決定した。

【0118】

(c) 濁度アッセイ

Zn (II) 媒介 $A\beta_{1-40}$ 凝集が可逆性であるのに対し、pH 5.5 により誘導した $A\beta_{1-40}$ 凝集は不可逆性であった。従って、実験を Cu (II) / pH 媒介 $A\beta_{1-40}$ 凝集が可逆性であるか否かを決定するために行った。pH 7.4 での Cu (II) 誘導性 $A\beta_{1-40}$ 凝集は、EDTA キレート化の後には可逆性であったが、各々の新たな凝集サイクルに関して、凝集物の完全な再可溶化には長期間のインキュベーションを必要とした。この結果は、より多くの錯体凝集物がその

後の各凝集サイクルの間に形成されて、Cu (II) を除くためにペプチドへのキレート剤の接近を妨げたことを示唆する。このことは、完全な再可溶化が時間と共に生じ、かつAβが、Cu (II) 誘導性凝集/EDTA再可溶化に対して不可逆性である構造的コンホメーションを採らないという事実により支持される。

【0119】

Cu (II) 誘導性Aβ凝集の可逆性を調査するために、25 μM Aβ₁₋₄₀ および25 μM Cu (II) を、67mM リン酸緩衝液、150mM NaCl (pH7.4) 中で混合し、そして濁度測定を1分間隔で4回行った。引き続き、10mM EDTAまたは10mM Cu (II) のアリコート20 μl を、2分おいた後に交互にウェルに添加し、1分間隔でさらに4回読みとりを行う。最後のEDTA添加および濁度読みとりの後に、最後の読みとりを行う前に混合物をさらに30分間インキュベートした。濁度測定を、インキュベーション (30分間、37°C) の前に、金属イオンありまたはなしで、Aβ₁₋₄₀ストックを20mM HEPES緩衝液、150mM NaCl (pH6.6、6.8または7.4) 中で10 μM (300 μl) にしたことを除いて、Huangら、J. Biol. Chem. (提示した) により記載のように行った。

【0120】

pHが増強したCu (II) 誘導性Aβ₁₋₄₀凝集の可逆性を、インビボで見出され得るH⁺濃度極値を示す7.5~6.6のpH範囲を用いて濁度計より研究した (図5Aおよび5B)。10 μM Aβ₁₋₄₀および30 μM Cu (II) を67mM リン酸緩衝液、150mM NaCl (pH7.4) 中で混合し、そして最初の濁度測定を行った。引き続き、溶液のpHを6.6まで連続的に下げ、そして7.4に再び上げた。反応系のpHをマイクロプローブ (Lazar Research Laboratories Inc., Los Angeles, CA) を用いてモニターし、そして濁度を30分間まで5分間隔で読みとった。このサイクルを3回反復した。

【0121】

pH5.5で観察された不可逆性のAβ₁₋₄₀凝集とは異なり、Cu (II) 誘

導性 $A\beta_{1-40}$ 凝集は、7.4～6.6の間でpHが変動した場合、完全に可逆性であった。図5Aは、pH 7.4でのCu(II)誘導性 $A\beta_{1-40}$ 凝集の濁度分析がキレート剤(EDTA)の連続サイクルにより逆転したことを示す。図5Bは、pHが7.4～6.6の間で往復する場合のCu(II)誘導性 $A\beta_{1-40}$ 凝集の可逆性の濁度分析を示す。従って、ペプチド内の敏感なコンホメーション変化(狭いpHウィンドウ(生理学的に妥当な $[H^+]$ に対応する)内で $[H^+]$ を変化させることにより誘導される)は、Cu(II)の存在下でペプチドの凝集または再可溶化を可能にする。本データは、Cu(II)結合および $A\beta$ の凝集が、微小環境のpHが上昇する場合に生じることを示唆する。この結論は、反応が $[H^+]$ およびCu(II)依存性ならびに狭い生理学的に妥当なpHウィンドウ内で可逆性であるという知見に基づき得る。このことは、幅広いpH範囲(6.2～8.5)にわたる $A\beta_{1-40}$ の一定のZn(II)誘導凝集(および結合)と比較すると(Bush, A. I., *ら*, J. Biol. Chem. 269: 12152 (1994))、穏和な酸性条件下でのCu(II)結合の特異性および高親和性によりさらに支持される。

【0122】

(d) $A\beta_{1-40}$ 凝集物の低濃度の免疫濾過 (immunofiltration) 検出)

$A\beta_{1-40}$ の生理学的濃度 (80 nM) を、150 mM NaCl、20 mM HEPES (pH 6.6 または 7.4)、 $CuCl_2$ (0, 0.1, 0.2, 0.5 および 2 μ M) を含有する 100 nM BSA に添加し、そしてインキュベートした (30 分間、37°C)。次いで、反応混合物 (200 μ l) を 96 ウェル Easy-Titer (登録商標) ELISA (登録商標) システム (Pierce, Rockford, IL) に配置し、そして 0.22 μ m 酢酸セルロースフィルター (MSI, Westboro, MA) を通して濾過した。凝集した粒子をメンブレンに固定し (0.1% グルタルアルデヒド, 15 分)、徹底的に洗浄し、次いで、抗 $A\beta$ mAB 6E10 (Senetek, Maryland Heights, MI) でプローブした。プロットを洗浄し、そして ECL 化学発光試薬 (Amersham, Buckinghamshire, Eng

land) の存在下でフィルムに曝した。免疫活性を、免疫プロットから ECL フィルムの透過性分析により定量した。

【0123】

(e) A β 金属捕捉 ELISA)

^{64}Cu は非実用的に短命 ($t_{1/2} = 13$ 時間) であるので、金属捕捉 ELISA アッセイを用いて、 $\text{Cu}(\text{II})$ で含浸したマイクロタイタープレートへの A β_{1-40} の競合分析を行った。A β_{1-40} (1.5 ng/ウェル) を、 $\text{Cu}(\text{II})$ コーティングマイクロタイタープレート (Xenopore, Hawthorne, NJ) のウェル中で、Moirら, J. Biol. Chem. (示した) により記載されるように、漸増濃度の $\text{Cu}(\text{II})$ (1~100 nM) とともにインキュベートした (2 時間、37°C)。ウェル表面の残りのリガンド結合部位を、抗 A β mAB 6E10 (Senetek, Maryland Heights, MI) とともに室温で一晩インキュベートする前に、Tris 緩衝化生理食塩水 (TBS) 中の 2%ゼラチンでブロックした (3 時間、37°C)。セイヨウワサビペルオキシダーゼに結合体化した抗マウス IgG を各ウェルに添加し、そして 37°C で 3 時間インキュベートした。結合した抗体を安定なペルオキシダーゼ基質緩衝液 / 3, 3', 5, 5' -テトラメチルベンジジン (SPSB / TMB) 緩衝液とともに 30 分間インキュベートし、続いて 2M 硫酸を添加して検出した。吸光度の増加を 450 nm で測定した。結果を図 3 に示す。全てのアッセイを三連で行い、そして平均 \pm SD、 $n = 3$ であった。

【0124】

競合分析により、A β_{1-40} が少なくとも 1 つの高親和性、飽和可能な $\text{Cu}(\text{I})$ 結合部位を有する (pH 7.4 で $K_d = 900$ pM) ことが示された (図 3)。 $\text{Cu}(\text{II})$ は、 $\text{Zn}(\text{II})$ 誘導性凝集を減少させない (Bush, A. I., ら, J. Biol. Chem. 269: 12152 (1994)) ($\text{Cu}(\text{I})$ が結合した $\text{Zn}(\text{II})$ と置き換わらないことを示す) ので、2 つの別個の金属結合部位が存在するようである。このことは、上記の節 (c) および下記の節 (h) に記載されるように、異なる金属イオンの pH 感受性および非感受性相互作用両方が存在するという事実により支持される。

【0125】

(f) 死後の脳組織からのA β の発現)

ADを有する個体、ならびにAD状態を有さない個体の死後の脳組織からの前頭皮質(0.5 g)の同一領域を、金属キレート剤ありまたはなしのTBS(pH 4.7)中でホモジナイズした。ホモジネートを遠心分離し、そして可溶性上清のサンプルならびにペレットをSDSサンプル緩衝液に抽出し、そしてモノクローナル抗体(mAB) WO2を用いてウェスタンブロッティングによりA β 含有量についてアッセイした。データは、コントロール(若年成人)サンプル(n=12比較)と比較した、ADサンプルにおいて上清相へ抽出したA β の量を比較する代表的な結果を示す。N, N, N', N'-テトラキス(2-ピリジル-メチル)エチレンジアミン(TPEN)(5 μ M)は、非罹患脳組織において以前に認識されていないペレット化A β の集団の可視化を可能にする(図8)。

【0126】

Rohrerおよび共同研究者らは、最近、AD罹患皮質において沈着するA β の大部分が水に可溶化され得ることを示した(Rohrer, A. E. ら, J. Biol. Chem. 271:20631(1996))。インビトロ知見の臨床的関連性を支持すると、最近、使用したキレート剤は、亜鉛または銅に対する高親和性を有するので、金属キレート剤がRohrerらの技術により抽出された(中性生理食塩水緩衝液中で)A β の量を増加させることを示した。従って、TPENは、A β を抽出する際にTETAおよびバトクプロインと同様に、非常に効率的である。それに対して、EGTAおよびEDTAは、あまり効率的でなく、同レベルの回収を達成するためには高濃度を必要とする。抽出溶液に添加し戻された亜鉛イオンおよび銅イオン(5~50 μ M)は、A β の回収(これは、遠視分離した脳ホモジネート懸濁物のペレット画分中でSDSサンプル緩衝液により引き続き抽出される)を消失させるが、A β のキレート媒介抽出物に添加し戻されたCa(II)およびMg(II)は、これらの金属イオンがミリモル濃度で存在する場合ですら、AD罹患組織からのA β 再可溶化を消失させることができない。

【0127】

重要なことには、キレート媒介抽出物の金属含有量の原子吸収分光法アッセイにより、CuおよびZnがキレート剤によりAβとともに同時放出されることが確認される。これらのデータは、Aβ沈着物（おそらく無定型型）がCuおよびZnによりともに保持され、そしてFeもまた含み得ることを強く示す。

【0128】

興味深いことに、Aβは、キレート剤の使用なしでは、コントロール脳組織から抽出可能でない。このことは、金属がアセンブルしたAβ沈着物が、Aβプラーク病理の進行における初期の段階であり得ることを示唆する。

【0129】

（g）銅によるAβ架橋

Aβ : Aβ₁₋₄₀のCu (I) 誘導SDS耐性オリゴマー (2.5 μM)、150 mM NaClおよび20 mM HEPES (pH 6.6、pH 7.4およびpH 9) を、ZnCl₂またはCuCl₂を含み、またはいずれも含まずに、37°Cで30分間インキュベートした。インキュベーション後、各反応物のアリコート (2 ng のペプチド) を、0日目、1日目、3日目および5日目に収集し、そして抗Aβモノクローナル抗体6F10を使用してウェスタンブロットした。これらの条件下で形成されたダイマーは、共有結合されていることが見いだされた。より詳細には、Cu (I) (2~30 μM) は、Aβの共有結合性のオリゴマー形成を誘導することが見いだされた。類似の濃度のZn (I) との同時インキュベーションは、架橋を加速するが、亜鉛単独では、効果を有さなかった。抗酸化剤メタ亜硫酸ナトリウムは、この反応を中程度に減弱させるが、アスコルビン酸は、Aβ架橋を劇的に加速する。このことは、後者によるCu (I) からCu (I) への還元を示唆し、これが、Aβの共有結合性の架橋を媒介する。しかし、マンニトールは、架橋を消失させ、このことは、この架橋が、Cu (I) を漸加するフェントン反応による、ヒドロキシルラジカルの生成によって媒介されることを示唆する (図9)。ウェスタンブロット分析以外の、架橋の存在または非存在を可視化および/または決定する他の手段もまた、使用され得ることに留意する。このような他の手段としては、遠心分離による密度沈降が挙げられるが、これに限定されない。

【0130】

Zn(II) および Cu(II) による A β に対する沈降効果は、質的に異なることが見いだされた。Zn 媒介性の凝集は、キレート化と可逆的であり、そして一次ニューロン細胞培養物における神経毒性に関連しないが、Cu 媒介性の凝集は、共有結合された SDS 耐性ダイマーの緩やかな形成および神経毒性の誘導を伴う。これらの神経毒性 SDS 耐性ダイマーは、Rohrerら、J. Biol. Chem. 271: 20631 (1996) に記載されるものと類似する。

【0131】

(h) 生体金属 (biometal) 依存性および pH 依存性の A β 凝集

A β 溶解度に対する異なる金属および pH の効果を正確に定量化するために、合成ヒト A β ₁₋₄₀ (2.5 μ M) を、金属イオンの存在下、種々の pH で 30 分間インキュベート (37°C) した。得られた凝集化粒子を、遠心分離によって沈降させて、この上清中の可溶性 A β ₁₋₄₀ の測定を可能にした。これらの条件下で生成された凝集化粒子を完全に沈降させるために必要とされる、遠心分離時間を決定するために、A β ₁₋₄₀ を、金属なしで、Zn(II) (100 μ M) と共に、または Cu(II) (100 μ M) と共に、pH 5.5 で 30 分間、37°C でインキュベートした、反応混合物を、10,000 g で種々の時間、遠心分離するか、または 100,000 g で 1 時間、超遠心分離した。図 1 は、反応混合物の遠心分離後に残存する可溶性 A β ₁₋₄₀ の割合を示す。全てのデータの点は、平均 \pm SD、n=3 である。

【0132】

A β の N 末端ドメイン内のコンフォメーション変化は、[H⁺] を調節することによって誘導され (Soto, C. ら、J. Neurochem. 63: 1191-1198 (1994))、そして同じ領域に金属 (Zn(II)) 結合ドメインが存在する。従って、金属イオン誘導性の A β 凝集に対する pH の相乗効果が存在するか否かを決定するための実験を設計した。A β ₁₋₄₀ を、異なる生体必須金属イオンと共に、pH 6.6、pH 6.8 および pH 7.4 でインキュベートし、そして遠心分離に供した (20 分、10,000 g)。これらの結果を、図 2 B に示す。ここで、「全ての金属」とは、指示された濃度で各々の金属

イオンを含む、組み合わせでのインキュベーションを示す。

【0133】

凝集の指標として濁度測定 (turbidometry) を使用して得られた結果を、図2Aおよび2Cに示す。これらのデータは、吸光率が、pH 6.6、pH 6.8およびpH 7.4で、金属イオンを含む反応混合物と金属イオンを含まない反応混合物との間で変化することを示す。従って、A β 1-40は、pH非感受性およびpH感受性の金属結合部位の両方を有する。

【0134】

このデータは、pH単独が、A β の溶解度に劇的に影響し、インキュベーションのpHがペプチドのpH (pH約5~6) に近づく場合に、凝集を誘導することを示す。pHが6.2より高い場合、亜鉛は、このペプチドの40~50%の沈降を誘導する。しかし、pHが、5.0以上の場合、Zn (II) は、A β の溶解度に対してほとんど影響を有さない。pH 6.2とpH 5.0の間では、Zn (II) および [H⁺] の沈降効果は付加的ではない。

【0135】

このデータはさらに、非常にわずかな酸性の条件下で (例えば、乳酸アシドーシス性AD脳における)、Cu (II) が、未知のコンフォメーションシフトによってA β の凝集を顕著に誘導することを示す。Cu (II) は、A β の沈降においてZn (II) よりも効果的であり、そして生理学的に関連するpH 6~7でさえ凝集を誘導する。A β の銅誘導性凝集は、AD脳のアシドーシスの条件に匹敵する、pHが7.0以下に降下する場合に生じる (Yates, C. M. ら、J. Neurochem. 55:1624 (1990))。この系における他のほとんどの金属イオンの沈降効果の研究は、A β の金属イオン凝集が、上記で例示したように、銅および亜鉛に限定されるが、Fe (II) が、沈降を誘導する部分的能力を保持することを示した (Bush, A. I. ら、Science 268:1921 (1995))。

【0136】

これらの結果はさらに、[H⁺] によって誘導されたA β におけるわずかなコンフォメーション変化が、A β 1-40の金属イオン (特に、Cu (II)) との相

相互作用を促進し、これが、この $[H^+]$ に依存する自己凝集または再溶解を可能にすることを示唆する。例えば、7.0未満へのpHの低下は、 β シートコンフォメーションを増加する(Soto, C. ら, J. Neurochem. 63: 1191-1198 (1994))。これは、Cu(II)が可溶性A β に結合することを可能にし得、このことがさらに、自己凝集を可能にするか、または凝集体を形成する分子の会合を可能にするように、A β のコンフォメーションを変化させ得る。逆に、7.0を超えるpHの上昇は、 α ヘリックスシートコンフォメーションを促進する(Soto, C. ら, J. Neurochem. 63: 1191-1198 (1994))。これは、ダイマー性の凝集化A β のコンフォメーション状態を変更し得、このことが、銅を放出し、それによってこの凝集体を不安定化して、A β の溶液への放出を生じる。従って、Cu(II)の存在下で、A β は、 $[H^+]$ に依存して凝集状態と可溶性状態との間で振動する。

【0137】

A β の溶解度とpHのこの二相性の関係は、A β のN末端フラグメント(残基1~28)内のCDスペクトルにおいて以前に観察されたコンフォメーション変化を反映する(Soto, C. ら, J. Neurochem. 63: 1191-1198 (1994)) (すなわち、約1~4の間および約7より高いpHでの α -ヘリックス、ならびに約4~7の間のpHでの β -シート)。pH約5.5での不可逆的なA β 凝集体の形成は、 β -シートコンフォメーションが、アミロイドへのA β 凝集の経路である仮説を支持する。穏やかな酸性条件下でZn(II)およびCu(II)によって生成された凝集体(図5Aおよび5B)は、キレート剤/pHにより可逆的であるので、これらのコンフォメーションは、より高いエネルギーの α -ヘリックスコンフォメーションであり得る。

【0138】

A β のコンフォメーション状態および溶解度は、異なるpHで変化するので(Soto, C. ら, J. Neurochem. 63: 1191-1198 (1994))、Zn(II)誘導性およびCu(II)誘導性のA β ₁₋₄₀凝集に対する $[H^+]$ の効果を、さらに研究した。結果を、図4A、4Bおよび4Cに示

す。図4 Aは、緩衝化生理食塩水±Zn (II) (30 μM) またはCu (II) (30 μM) 中のpH 3.0~8.8でのインキュベーション (30分、37℃) および遠心分離 (10,000 g、20分) 後の上清中に残存する可溶性Aβ₁₋₄₀の割合を示し、これは、開始ペプチドのパーセンテージとして表した。全てのデータの点は、平均±SD、n=3である。[H⁺] 単独では、溶液がpH 7.4以下に低下した場合に、Aβ₁₋₄₀を (2.5 μM) を沈降させ、そして一旦pHが約6.3以下に降下すると、劇的に沈降させた (図4 A)。pH 5.0で、80%のペプチドが沈降するが、このペプチドは、pH 5.0以下の酸性環境によって凝集されず、これは、Aβの溶解度に対するpHの効果についての初期の報告を確認および伸展する (Burdick, D., J. Biol. Chem. 267: 546-554 (1992))。Zn (II) (30 μM) は、pH 6.2~8.5の間で定常レベル (約50%) の凝集を誘導するが、pH 6.0以下では、凝集は、[H⁺] の効果のみによって説明され得る。

【0139】

Cu (II) (30 μM) の存在下で、8.8から7.4へのpHの低下は、Aβ₁₋₄₀溶解度の顕著な降下を誘導したが、pH 7.4より低いわずかな低下が、このペプチドの凝集に対するCu (II) の効果を顕著に増強した。図7を参照のこと。驚くことに、Cu (II) は、穏やかなアシドーシス性環境をほぼ表すpH 6.8で、85%より多い利用可能なペプチドに凝集を引き起こした。従って、[H⁺] のわずかな上昇によって引き起こされたAβのコンフォメーション変化は、Aβの迅速な自己凝集を導く、第2の金属結合部位の露出を生じる。pH 5.0以下で、Zn (II) およびCu (II) の両方のAβを凝集する能力は減少され、これは、AβへのZnの結合が、ヒスチジン残基のプロトン化におそらく起因して、pH 6.0以下で消失されるという事実 (Bush, A. I.ら、J. Biol. Chem. 269: 12152 (1994)) と一致する。

【0140】

次いで、Aβ₁₋₄₀溶解度に対するpHとCu (II) との間の関係を、以下の実験によってさらに規定した：異なるCu (II) 濃度 (0、5、10、20お

よび30 μ M)を用いたpH 5.4~7.8でのインキュベーション(30分、37°C)および遠心分離(10,000 g、20分)後の上清に残存する可溶性のA β ₁₋₄₀の割合を測定し、そして開始ペプチドのパーセンテージとして表した。全てのデータの点は、平均 \pm SD、n=3である(図4B)。pH 7.4で、Cu(II)誘導性のA β 凝集は、同じ濃度範囲でのZn(II)によって誘導された凝集より、50%低く、これは、初期の報告(Bush, A. I. ら、J. Biol. Chem. 269:12152(1994))と一致する。A β 凝集の生成における[H⁺]とCu(II)との間には、強い関係が存在する。すなわち、pHが降下する場合、同じレベルの凝集を誘導するのに必要とされるCu(II)は少なく、これは、[H⁺]が、Cu(II)誘導性のA β ₁₋₄₀凝集を制御することを示唆する。

【0141】

この反応が、生理学的濃度のA β ₁₋₄₀およびCu(II)を生じることを確認するために、新規な濾過免疫検出システムを使用した。この技術は、異なる濃度のH⁺およびCu(II)の存在下での、A β ₁₋₄₀凝集の相対量の決定を可能にした(図4C)。詳細には、異なるCu(II)濃度(0, 0.1, 0.2および0.5 μ M)の存在下、pH 7.4およびpH 6.6でのnm濃度のA β ₁₋₄₀の相対的な凝集を、この方法によって測定した。データは、免疫プロット濃度測定の前平均反射率の値を表し、これは、このペプチドを、Cu(II)の非存在下で処理する場合に得られるシグナルの比として表される。全てのデータの点は、平均 \pm SD、n=2である、この高感度の技術は、生理学的濃度のA β ₁₋₄₀が、穏やかな酸性条件下で凝集すること、および凝集が、約200 nmほどの低濃度のCu(II)の存在によって、非常に増強されることを確認した。さらに、より高いA β ₁₋₄₀濃度で以前に観察されたように、7.4から6.6へのpHの低下は、生理学的濃度のA β ₁₋₄₀の凝集に対するCu(II)の効果を増強した。従って、A β ₁₋₄₀凝集は、Cu(II)が利用可能である場合、8 nmに下がるまで濃度非依存性である。

【0142】

頭部損傷後のA β 沈着およびAPP免疫反応性の数日以内の迅速な出現が(R

Robert, G. W. ら、Lancet. 338:1422-1423 (1991); Pierce, J. E. S. ら、Journal of Neuroscience 16:1083-1090 (1996))、ADにおける数ヶ月または数年にわたる、より高密度なコアアミロイド班へのより漸進的なA β の蓄積よりもむしろ、この時間枠におけるZn(II)、Cu(II)の放出および穏やかなアシドーシスと一致し得る。従って、pH/金属イオン媒介性の凝集は、脳の老化、および頭部損傷後において観察される無定形のA β 沈着の基礎を形成し得、これが、内皮およびニューロンの完全性を維持することを可能にしながら、構造的機能の減少を導き得る、損傷に関連する酸化的ストレスを制限する。

【0143】

(考察)

これらの結果は、以下のA β を凝集し得る、3つの生理学的な可能性のある条件が存在することを示す：pH (Fraser, P. E. ら、Biophys. J. 60:1190-1201 (1991); Barrow, C. J. および Zagorski, M. G., Science 253:179-182 (1991); Burdick, D., J. Biol. Chem. 267:546-554 (1992); Barrow, C. J. ら、J. Mol. Biol. 225:1075-1093 (1992); Zagorski, M. G. および Barrow, C. J., Biochemistry 31:5621-5631 (1992); Kirshenbaum, K. および Daggett, V., Biochemistry 34:7629-7639 (1995); Wood, S. J. ら、J. Mol. Biol. 256:870-877 (1996))、Zn(II)の濃度 (Bush, A. I. ら、J. Biol. Chem. 269:12152 (1994); Bush, A. I. ら、Science 265:1464 (1994); Bush, A. I. ら、Science 268:1921 (1995); Wood, S. J. ら、J. Mol. Biol. 256:870-877 (1996))、および穏やかな酸性条件下での、Cu(II)の濃度。

【0144】

興味深いことに、金属イオン濃度およびpHにおける変化は、損傷に対する炎

症応答の通常の特徴である。従って、Cu (II) および Zn (II) への A β への結合は、炎症プロセスの間に特に重要であり得る。なぜなら、炎症の局所部位は、酸性になり得 (Trehaut, P. S. および McCarty, D. J. , Arthr. Rheum. 14: 475-484 (1971) ; Menkin, V. , Au. J. Pathol 10: 193-210 (1934))、そして Zn (II) および Cu (II) の両方は、炎症に応答して迅速に移動されるからである (Lindeman, R. D. , ら, J. Lab. Clin. Med. 81: 194-204 (1973) ; Terhune, M. W. および Sandstead, H. H. , Science 177: 68-69 (1972) ; Hsu, J. M. ら, J. Nutrition 99: 425-432 (1969) ; Haley, J. V. , J. Surg. Res. 27: 168-174 (1979) ; Milaninio, R. ら, Advances in Inflammation Research 1: 281-291 (1979) ; Frieden, E. , in Inflammatory Diseases and Copper, Sorenson, J. R. J. 編, Humana Press, New Jersey (1980), 159-169頁)。

【0145】

血清銅レベルは、セルロプラスミンの増加に関連する炎症の間に増加する。このセルロプラスミンは、基礎代謝および創傷治癒のプロセスにおいて活性な酵素 (例えば、チトクロムオキシダーゼおよびリジロオキシダーゼ (Giampao, V. ら, in Inflammatory Diseases and Copper, Sorenson, J. R. J. 編 Humana Press, New Jersey (1980), 329-345頁; Peacock, E. E. および van Winkle, W. , in Wound Repair, W. B. Saunders Co. , Philadelphia (1976), 145-155頁)) に Cu (II) を付与し得る Cu (II) 輸送タンパク質である。セルロプラスミンからの Cu (II) の放出は、第二銅イオンが、その第一銅形態に還元される酸性環境によって、非常に促進されるので (Owen, C. A. , Jr. , Proc. Soc. Exp. Biol. Med 149:

681-682 (1975))、穏やかなアシドーシスの期間は、遊離Cu (I) の増加の環境を促進し得る。同様に、別のアミロイドタンパク質である、急性期反応物質、血清アミロイドP成分 (SAP) の、細胞壁ポリサッカリドである、ザイモサンへの凝集が、酸性pHで、Cu (II) により観察されている (Potempa, L. A. ら、Journal of Biological Chemistry 260:12142-12147 (1985))。従って、pHが低下した期間のCu (II) のA β ₁₋₄₀への交換は、穏やかな酸性条件下で、その細胞によって必要とされるこのタンパク質の生化学的反応性を変化させるための機構を提供し得る。このような機能は、炎症の局所部位での、A β の凝集/接着特性 (図1~5B) または酸化機能における変化を含み得る。

【0146】

(実施例2)

(アルツハイマーのA β ペプチドのフリーラジカル形成およびSOD様活性)

(a) Cu (I) およびFe (II) の測定

この方法は、血清中の銅および鉄をアッセイするプロトコル (Landers, J. W. およびZak, B. Chim. Acta. 29:590 (1958)) から改変する。これは、バトクプロインニスルホン酸 (bathocuproinedisulfonic) (BC) アニオンと錯化したCu (I)、およびバトフェナントロリンニスルホン酸 (bathophenanthrolinedisulfonic) (BP) アニオンと錯化したFe (II) について、それぞれ、483nmおよび535nmの最適な可視吸収波長が存在するという事実に基づく。これらの2つの錯体のモル吸収の決定は、本質的に以下のように達成した: 500 μ lの各錯体 (過剰のBCおよびBPリガンドを含む、PBS, pH7.4中、500 μ M) のアリコート、1cmの通過距離 (path length) の石英キュベットにピペットし、そしてそれらの吸光率を測定した。モル吸光度を、ランベルトーベールの法則に基づいて決定した。Cu (I) - BCは、2762M⁻¹cm⁻¹のモル吸光率を有し、一方、Fe (II) - BPは、7124M⁻¹cm⁻¹のモル吸光率を有する。

【0147】

96ウェルプレートにおけるCu(I)-BCおよびFe(II)-BPについての等価な垂直方向の通過距離の決定を、本質的に以下のように行った；500 μM、100 μM、50 μMまたは10 μM濃度の関連する金属イオン（Cu(I) およびFe(II)）との、その2つの錯体の吸光率を、96ウェルプレートリーダー（300 μl）およびUV分光計（UV-vis spectrometer）（500 μl）によって決定した（コントロールブランクとして、PBS, pH7.4）。このプレートリーダーから得られた吸光率を、UV分光計による吸光率に対して回帰させる。測定をプレート上で行う場合、線形回帰直線の傾きkが、垂直方向の通過距離に等価である。これらの結果を以下に示す：

【0148】

【数1】

	k(cm)	r ²
Cu(I)-BC	1.049	0.998
Fe(II)-BP	0.856	0.999

モル吸光率および等価な垂直方向の通過距離を考慮すると、Cu(I) またはFe(II) の濃度（μM）は、コントロールとして適切な緩衝液を使用して、ランベルトーベールの法則に基づいて、以下のように推定され得る：

【0149】

【数2】

$$C_{u^{+}}^{\text{t=702}} : [Cu^{+}](\mu M) = \frac{\Delta A(483nm)}{(2762 \times 1.049)} \times 10^6$$

$$F_{e^{2+}}^{\text{t=712}} : [Fe^{2+}](\mu M) = \frac{\Delta A(535nm)}{(7124 \times 0.856)} \times 10^6$$

ここで、ΔAは、サンプルとコントロールブランクとの間の吸光率の差である。

【0150】

(b) H_2O_2 の測定)

この方法は、Han, J. C. ら (Anal. Biochem. 234: 107 (1996)) によって報告された H_2O_2 アッセイを改変する。96ウェルプレート上での、この改変した H_2O_2 アッセイの利点としては、高処理能であること、優れた感度(約 $1\mu M$)であること、そして H_2O_2 の不安定な化学特性に起因して問題となる H_2O_2 の標準曲線の必要性を排除することが挙げられる。

【0151】

$A\beta$ ペプチドを、PBS (pH 7.4 または 7.0) 中、 $37^\circ C$ で 30 分間、 H_2O_2 捕捉試薬 (トリス (2-カルボキシエチル) -ホスフィンヒドロクロリド) (TCEP) ($100\mu M$) と共に同時インキュベートした。次いで、5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB) ($100\mu M$) を添加して、残存する TCEP と反応させた。この反応の生成物は、 $412 nm$ の特徴的な最大吸収率を有する。このアッセイを、標準的な吸光率範囲を使用して 96 ウェル形式に適応させた。図 11 に示されるように、 $A\beta_{1-42}$ ($10\mu M$) を、周囲空気下 (第 1 の棒)、連続的なアルゴンパージング (Ar)、pH 7.0 での連続的な酸素富化 (O_2)、または鉄キレート剤デスフェリオキサミン (DFO) ($220\mu M$) の存在下のいずれかで、 $37^\circ C$ 、pH 7.4 で 1 時間インキュベートした。改変体 $A\beta$ 種 ($10\mu M$) もまた試験した。 $A\beta_{1-40}$ 、ラット $A\beta_{1-40}$ (r $A\beta_{1-40}$) および混合 (scrambled) $A\beta_{1-40}$ (s $A\beta_{1-40}$) を、周囲空気下、 $37^\circ C$ 、pH 7.4 で 1 時間インキュベートした。値 (平均 \pm SD、 $n=3$) は、3 連のサンプラー (カタラーゼ ($10 U/ml$)) の存在下で同一の条件下で行ったコントロールサンプル由来の値) を表す。

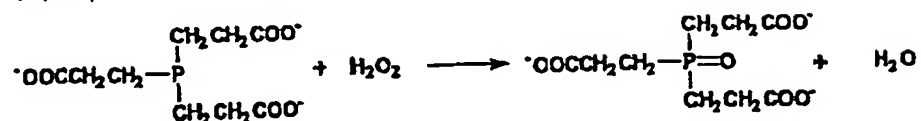
【0152】

この新規な方法についての化学的スキームは、以下である：

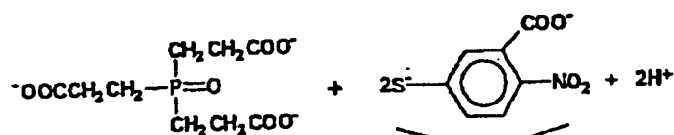
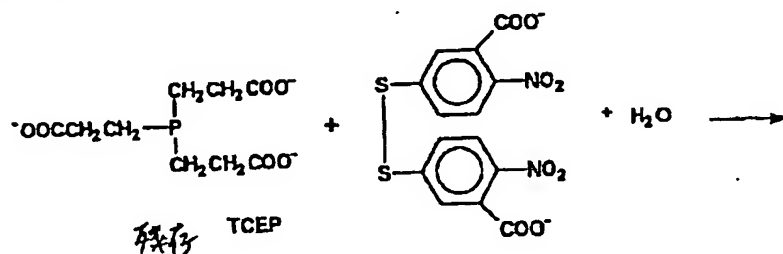
【0153】

【化 1】

スキーム I:

(TCEP) [H₁₇ (2-カルボキシエチル) ホスフィン]

スキーム II:

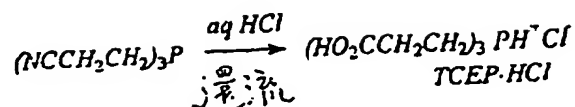


↓
14,150 cm^{-1} のモル吸光率の、
412 nm. での 最高吸収ピークを
有する

TCEP・HCl を、以下に示されるように、水性 HCl を還流下で、トリス (2-シアノエチル) ホスフィン (Johnson-Mathey (Wayd hill, MA) から購入した) を加水分解することによって合成した (Burns, J. A. ら、J. Org. Chem. 56: 2648 (1991)) :

【0154】

【化2】



96ウェルプレートにおいて上記のアッセイを実行するために、96ウェルプレートにおける2-ニトロ-5-チオ安息香酸(TMB)の等価な垂直方向の通過距離を計算する必要があった。この決定は、本質的に、上記にCu(I)-BCおよびFe(II)-BPについて記載したように行った。このプレートリーダーから得られた吸光率を、UV分光計による吸光率に対して回帰させる。測定をプレート上で行う場合、線形回帰直線の傾きkが、垂直方向の通過距離に等価である。これらの結果を以下に示す：

【0155】

【数3】

k	r ²
0.875	1

次いで、H₂O₂の濃度を、以下に示されるように、サンプルとコントロール（サンプル+1000U/μlカタラーゼ）との間の吸光率の差から推定し得る：

【0156】

【数4】

$$[H_2O_2] (\mu M) = \frac{\Delta A(412nm)}{(2 \times 0.875 \times 14150)}$$

(c) OH[·]の測定)

OH[·]の測定は、Gutteridgeら(Biochim. Biophys. Acta 759:38-41(1983))に記載のように行った。

【0157】

(d) $A\beta$ によるCu (I) 生成: Zn (II) およびpHの影響)

$A\beta$ (PBS、pH 7.4 または 6.8 中、 $10\mu\text{M}$) を、Cu (II) ($10\mu\text{M}$) \pm Zn (II) ($10\mu\text{M}$) の存在下で30分間インキュベート (37°C) した。Cu (I) レベル ($n=3$ 、 $\pm\text{SD}$) を、標準曲線に対してアッセイした。これらのデータは、Zn (II) の存在が、穏やかな酸性環境下でCu (II) の還元を媒介し得ることを確証する。この反応に対する亜鉛の効果は、明らかに強力であるが、複雑である。 $10\mu\text{M}$ 亜鉛の存在は、このペプチドを沈降するので、ペプチドが溶解相に存在しない場合でさえ、このペプチドが酸化還元活性を保持することが明らかであり、このことは、皮質の $A\beta$ 沈着物が、これらの高度に反応性の生成物を生じる点において、不活性でないことを示唆する。大脳の亜鉛代謝は、ADにおいて調節されず、従って、間質性の亜鉛のレベルが、 $A\beta$ によって生じるCu (I) および H_2O_2 生成の調整において重要な役割を果たし得る。

【0158】

(結果)

($A\beta$ は、金属依存性および金属非依存性の酸化還元活性を示す)

Multhaupらによって使用された、バトクプロイン還元およびバトフェナントロリン還元金属アッセイ技術を使用して、APP自体が、そのエクストドメイン上でCu (II) 還元部位を保有することを決定した (Multhaup, G. ら、Science 271: 1406 (1996))。この還元金属アッセイの使用における注意の1つは、この検出試薬が、Cu (II) またはFe (III) の酸化能力を過大評価し得ることであるので、他の酸化還元生成物を、金属イオンを含まない指示薬を必要とするアッセイによって調査した。過酸化水素は、 $A\beta$ 種によって迅速に形成されることが発見された (図11)。従って、 $A\beta$ は、亜鉛を結合しながら、 H_2O_2 および還元された金属の両方を生じる。構造的に、小さいペプチドを認識することは困難であるが、本発明者らは、最近、 $A\beta$ が、生理学的緩衝液中でダイマーであることを示した。 H_2O_2 および還元された金属種は、同じ近傍に生成されるので、これらの反応生成物は不安定であり、フェントン化学による高度に毒性のヒドロキシラジカルを生じ、そしてこれら

のペプチドからのヒドロキシラジカルの形成は、現在、チオバルビツール酸アッセイで示されている。ヒドロキシラジカルの形成は、このペプチドの共有結合性のポリマー化に相関し（図9）、そしてヒドロキシルスカベンジャーによってブロックされ得る。従って、脳間質環境中のFe、Cu、ZnおよびH⁺の濃度は、直接的（ダイマー形成）および間接的（Fe(II)/Cu(I)およびH₂O₂形成）な機構による、Aβについての沈降の促進および神経毒性において重要であり得る。

【0159】

AβによるH₂O₂生成は、H₂O₂が神経毒性を媒介することを記載する機構（Behl, C. ら、Cell 77:827（1994））を説明し、これは、以前は、細胞の過剰生成のみの生成物であると考えられていた。興味深いことに、混合Aβペプチドは、検知できるほどのH₂O₂を生成するが（図6）、ヒドロキシラジカルを生成しない。これは、この混合Aβペプチドが、金属イオンを還元し得ないからである。従って、本発明者らは、Aβをこのような強力な神経毒にするものが、還元された金属およびH₂O₂の両方を同時に生成するAβの能力であり、特に、H₂O₂がこのペプチドの近傍から迅速に排除されない場合に、フェルトン反応によってヒドロキシラジカルを生じるということを結論付ける。カタラーゼおよびグルタチオンペルオキシダーゼは、H₂O₂を異化する主な手段であり、そしてそれらのレベルは、脳（特にADにおける）において低く、これがおそらく、上記で考察したように、Aβの脳組織における蓄積への傾向を説明する。

【0160】

（実施例3）

（a）一般に使用されるSODアッセイにおけるAβ活性

Aβの抗スーパーオキシド効果がインビボにおいて明らかであることを確立するために、家族性AD（FAD）変異を有するヒトAPPのカルボキシ末端の100アミノ酸を発現するトランスジェニックマウス系統（マウス系統TgC100、V717F）および家族性AD（FAD）変異を有さないヒトAPPのカルボキシ末端の100アミノ酸を発現するトランスジェニックマウス系統（マウ

ス系統 TgC100. WT) の2つのトランスジェニックマウス系統を、研究した (Li Q. X., et al., J. Neurochem. (1999))。これらのマウスは、ADの任意の代表的な神経病理学特徴を示さない。ヒト $A\beta$ の過剰発現に加えて、TgC100. V717Fマウスは、APP遺伝子の717残基において変異を保有し、そして結果として、中程度に上昇したレベルの $A\beta_{1-42}$ を生成する (Suzuki, N., et al., Science 264. 1336-1340 (1994))。

【0161】

(方法)

(線維芽細胞培養)

線維芽細胞を2匹のTgC100. WTおよび2匹のTgC100. V717Fマウスの尾部から収集した。組織を、5mlの0.25%コラゲナーゼ(w/v)中で細かく刻み、そして時折振盪しながら2×30分間、37℃、5% CO₂でインキュベートした。2分間1000gでの遠心分離およびPBSでの2回の洗浄の後、組織サンプルを、補充された培養培地(DMEM+10% FCS)を含む培養フラスコに移し、そして3~5日間、37℃、5% CO₂でインキュベートした。線維芽細胞を、2~3継代にわたり、コンフルエンスにまで増殖させ、次に3~5×10⁴細胞/ウェルで48ウェルプレートに(キサンチンオキシダーゼ処理)、または0.5×10⁶細胞/ウェルで6ウェルプレートに(グルタチオンアッセイ)移した。

【0162】

(キサンチン/キサンチンオキシダーゼを用いる用量応答)

複数のウェルプレート内の線維芽細胞を、75 μ Mのキサンチン、および漸増する濃度のキサンチンオキシダーゼ(0、0.2、0.5および1U/ml)で処理した。コントロール細胞をキサンチンおよび/またはキサンチンオキシダーゼの不在下でインキュベートした。三連のウェルを、各処理のために使用した。37℃、5% CO₂でのオーバーナイトでのインキュベーションの後に、細胞の生存度を、MTTアッセイを使用してアッセイした。

【0163】

(合成A β 1-42およびSOD1を用いる処理)

TgC100, WT線維芽細胞を、48ウェルプレート中に、 1×10^4 細胞/ウェルで培養し、そして50 μ Mのキサンチンおよび0.2U/mlキサンチンオキシダーゼを用いて処理した。コントロール細胞を、キサンチンオキシダーゼの不在下でインキュベートした。6つのウェルを、各処理のために使用した。さらに、いくつかの線維芽細胞を、新鮮に調製した合成A β 1-42 (0.1~10 nm) または50U/mlのSOD1を用いて処理した。37°C、5% CO₂でのオーバーナイトでのインキュベーションの後に、細胞の生存度を、MTTアッセイを使用してアッセイした。

【0164】

SOD1、A β ペプチド、インスリンおよびアミリン (r=ラット、h=ヒト) を、O₂⁻検出剤として作用するニトロブルーテトラゾリウム (NBT、0.1 mM) を含むPBSおよびEDTA (0.1 mM) pH7.4中のキサンチン (1 mM) およびキサンチンオキシダーゼ (0.015 U/ml) の混合物に対して、添加した (0.5 μ M)。吸光率の変化 (560 nm) を、NBTに対するO₂⁻反応性を示すパープルホルマザン (purple formazan) 形成について、3分間にわたってモニターした。0.5 μ M SOD1によって生じる阻害 (100%) と比較した、NBTに対するO₂⁻反応性のパーセント阻害を、A β ペプチドのSOD様活性を比較するために使用した。図1を参照のこと。

【0165】

(結果)

インビボにおける中程度に増加したA β 1-42のレベルが、増加した抗酸化能をもたらすという仮説を試験するために、線維芽細胞をC100トランスジェニックマウスから培養し、そしてキサンチン/キサンチンオキシダーゼによって媒介されるO₂⁻チャレンジに曝露した。生存度アッセイによって評価した場合 (図14A)、A β 1-42を過剰発現する細胞 (TgC100, V717F) は、過剰発現していない細胞 (TgC100, WT) よりも、スーパーオキシド損傷に対する感受性が低かった。過剰発現する細胞中のA β 1-42が、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 様の様式において防御するか否かを試験するために、WT線

維芽細胞を、外来性の合成 $A\beta_{1-42}$ およびSOD1を用いてレスキュー (rescue) した。ナノモル濃度の新鮮に調製したヒト $A\beta_{1-42}$ は、スーパーオキシド損傷に対するTgC100、WT線維芽細胞の耐性を増加した (図14B)。この効果は、50 U/mlのSOD1での処理に匹敵した。このことは、 $A\beta_{1-42}$ が、SOD1模倣物として作用し得ることを示唆する。

【0166】

このデータは、 $A\beta$ が抗酸化薬として合目的的に放出され得るという仮説を支持する。酸化ストレス (例えば、スーパーオキシドストレス) に対する応答としてのペプチドの放出は、なぜ酸化ストレス (例えば、頭部損傷後) に関連する神経学的事象において、そのペプチドが散在する沈着物として凝集するのか (Roberts, G. W., et al., Lancet 338:1422-1423 (1991))、なぜ細胞に酸化ストレスがかかる場合、そのペプチドの放出が観察されるのか (Frederikse, P. H., et al., J. Biol. Chem. 271:10169-10174 (1996))、およびいかにしてそのペプチドがインビトロにおいて脳の膜の脂質の過酸化を阻害するように作用するのか (Andorn, A. C. およびKalaria, R. N., Neurobiol. Aging 19 (4S): S40 (1998)) を説明し得る。マイクロモル濃度で神経毒ではあるが、 $A\beta_{1-42}$ は、最初は、低ナノモル濃度で、細胞培養物中で、抗酸化特性と両立する神経栄養活性を示すことが報告された (Yankner, B. A., et al., Science 250:279-282 (1990))。

【0167】

(b) $A\beta$ の抗スーパーオキシド機能を阻害する薬物を決定するためのスクリーニング試験

試験化合物を $A\beta$ 溶液に添加して、SOD様活性を、そのような活性を測定する任意の方法 (例えば、パルス放射線分解)、または高スループットシステム (NBTアッセイ) によって測定する (図12)。抗酸化剤である $A\beta$ が系 (通常、キサンチン/キサンチンオキシダーゼによる) において生成されたスーパーオキシドを除去する能力を阻害しない試験化合物を、 $A\beta$ のインビボにおける抗酸

化機能を阻害しないと予測し得る。

【0168】

(c) H_2O_2 生成のための O_2 の使用、および $A\beta$ がスーパーオキシドの不均化を触媒するか否かを測定するための試験

H_2O_2 生成のための O_2 の使用が、基質特異性の誤差を反映し得ること、および $A\beta$ がスーパーオキシドの不均化をも触媒し得ることが疑われた。これらの可能性を試験するために、SOD触媒活性の研究のために以前に開発された手順に従ってメタル化された合成 $A\beta_{1-40}$ および $A\beta_{1-42}$ の存在下においてパルス放射線分解によって生成されたスーパーオキシドの崩壊を研究した(Goto, J. J., et al., J. Biol. Chem. 273 (46):30104-9 (1998))。

【0169】

(方法)

(合成ペプチド)

$A\beta$ ペプチド1~40および1~42を、W. Keck Laboratory, Yale University, New Haven, CT. によって合成した。確認するデータを、他の供給源(U. S. Peptides, Bachem (Torrance, CA)、およびSigma)から合成されそして入手された $A\beta$ ペプチドを用いる再現性実験によって得た。 $A\beta$ ペプチドストック溶液を、公開された手順に従って水で処理して計量したChelex-100樹脂(BioRad, CA)中で調製した(Atwood, C. S., et al., Journal of Biological Chemistry 273:12817-12826 (1998))。メタル化したペプチドを調製するために、 $A\beta$ ($60\mu M$)を、 $Cu(II)$ -グリシン、 $Zn(II)$ -グリシン(13) ($300\mu M$)、またはその両方とともに、PBS (66 mMホスフェート、150mM NaCl、pH 7.4)中で24時間37°Cでともにインキュベートした。予測されたとおり(Bush, A. I., et al., Science 265:1464-1467 (1994); Atwood, C. S., et al., Journal of Biological Chem

istry 273:12817-12826 (1998))、CuおよびZnは、迅速にA β を沈殿させ、そしてペプチド-金属イオン調製物を、実験研究のための懸濁液として扱った。メタル化ペプチド混合物を、徹底的に、Chelex-100樹脂処理した二重に蒸留した水(5 \times 2時間 \times 1リットルの交換)に対して透析(3, 5 kDカットオフ、Pierce)して、結合していない金属、低親和性の結合金属を取り除いた。A β のZn-媒介性の凝集およびCu-媒介性の凝集は可逆的であるので(Huang, X., et al, J. Biol. Chem. 272:26464-26470 (1997); Atwood, C. S., et al., Journal of Biological Chemistry 273:12817-12826 (1998))、この処理は、再度可溶化される大量のペプチド凝集物を生じた。メタル化していないペプチド産物およびメタル化したペプチド産物、ならびに実験緩衝液を、誘導結合プラズマ質量分析法(Varian Ultramass 700, Melbourne, Australia)および原子吸光分光によって、金属含量または金属夾雑物について測定した。

【0170】

(パルス放射線分解)

SOD活性の測定を、2 MeVのバン・デ・グラーフ電子加速装置および速度論(kinetic) UV/VIS分光システムを使用する(Department of Chemistry, Brookhaven National Laboratory, Upton, NY)パルス放射線分解によって行った(Cabelli, D. E., et al., J. Am. Chem. Soc. 109(12):3665-3669 (1987))。1.8 MeVエレクトロンのパルス(>>500 nsパルス持続時間)を、空気で飽和したPBS(pH 7.4, 10 mMのギ酸を含む、25 $^{\circ}$ C)中のA β ペプチド(1~20 μ M)を含む石英セル(2 cm光路長)に送達した。線量測定を、KSCN線量計を使用して確立した((SCN)が、6.13のG値および472 nmでの7950 M $^{-1}$ cm $^{-1}$ のモル吸光係数を有すると仮定)。エレクトロンビームによる水の照射は、一次ラジカルである \cdot OH、 e_{aq}^{-} および \cdot Hを生成した。これらの

ラジカルは、以下の反応を通じて、ギ酸および酸素の存在下において、 $O_2^{\cdot -}$ に効率的に変換される： $\cdot OH + HCO_2^{\cdot -} \rightarrow CO_2^{\cdot -} + H_2O$ 、その後 $CO_2^{\cdot -} + O_2 \rightarrow CO_2 + O_2^{\cdot -}$ 、 $e_{aq}^- + O_2 \rightarrow O_2^{\cdot -}$ および $\cdot H + O_2 \rightarrow HO_2^{\cdot}$ が続き、ここで $HO_2^{\cdot} = H^+ + O_2^{\cdot -}$ である。 $O_2^{\cdot -}$ の崩壊を、250~270 nmでモニターし、そしてメタル化タンパク質の存在下での $O_2^{\cdot -}$ の触媒的不均化の一次速度 (k_{cat}) を、時間およびタンパク質モル濃度に関する吸光度の観察された変化 (260 nmでの k_{obs}) から抽出した。

【0171】

(結果)

A β の活性に対するCuおよびZnの個々の寄与を試験するために、A β の4つの調製物 (A β ₁₋₄₀およびA β ₁₋₄₂) を作製した：Znで処理したA β (Zn-A β)、Cuで処理したA β (Cu-A β)、CuおよびZnで同時に処理したA β (CuZn-A β)、およびいずれの金属イオンでも処理されなかったA β 。処理の後、ペプチド調製物を、徹底的に透析し、結合していない金属イオンを取り除き、そしてパルス放射線分解によって生成されたスーパーオキシドの一次崩壊に対するその対応する影響について研究した。

【0172】

メタル化していないA β (表1) およびZn-A β (図14Aおよび図14B、表1) が、スーパーオキシドの自然発生的な不均化に対して影響しないことが見出された。しかし、顕著な触媒活性が、Cu処理したA β 調製物について観察された (図14~15、表1)。Cu-A β ₁₋₄₂ジスムターゼ活性 ($2.24 \times 10^7 M^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、表1、図15B) は、Cu-A β ₁₋₄₀ジスムターゼ活性 ($6.4 \times 10^5 M^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、表1、図15A) よりもかなり高く、そして両方のCu処理したA β 調製物のSOD様活性は、Zn (I I) とともに処理することによって高度に増強された。CuZn-A β ₁₋₄₂活性 ($2.11 \times 10^8 M^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、表1、図15B) もまた、CuZn-A β ₁₋₄₀活性 ($2.90 \times 10^6 M^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、表1、図15A) よりもかなり高かった。並行した実験において、質量分析法およびポリアクリルアミドゲル電気泳動において、PBS (pH 7.4) 中の30 μM KO_2 で5分間インキュベートしたCuZnA β ₁₋₄₂の修飾は、見出され

なかった。このことは、スーパーオキシドの除去の際にペプチドが消費されないことを示唆する。 $\text{CuZn-A}\beta$ 調製物の k_{cat} は、ペプチド濃度の上昇に従って減少した (図 15 A および 図 15 B)。このことは、おそらく凝集のために、より高濃度において、このペプチドの不均化の触媒効率が低くなることを示唆する。

【0173】

ペプチド調製物に結合した金属の測定は、 $\text{A}\beta$ が Cu に結合した場合にのみ触媒活性を有することを明らかにした。 $\text{Cu-A}\beta_{1-40}$ および $\text{CuZn-A}\beta_{1-40}$ は、それぞれ 0.3 モル当量の Cu および 0.4 モル当量の Cu に結合する (表 1)。 $\text{Cu-A}\beta_{1-42}$ は、1 サブユニットあたり 0.7 モル当量の Cu に結合するが、 $\text{CuZn-A}\beta_{1-42}$ は、1.4 モル当量の Cu に結合する。このことは、 Zn とともにインキュベートすることが、 Cu のペプチドへの結合を増強することを示す。 Zn は、これらのペプチド調製物のいずれに対しても結合することが検出されなかった。

【0174】

$\text{A}\beta$ (1-40 または 1-42) のジスムターゼ活性 (k_{cat}) は、結合した Cu の 1 モルあたり指数関数的に増加した (図 15 C)。このことは、 k_{cat} がペプチドに媒介される因子によって増強され、そしてただ単に結合した Cu 当量に比例するものではないことを示す。 $\text{A}\beta_{1-40}$ および $\text{A}\beta_{1-42}$ は、 $\text{pH } 7.4$ において、1 サブユニットあたり 2 モル当量までの Cu に結合し得るので (Atwood et al、未公開の観察)、 $\text{A}\beta$ の酵素活性を最大化するためのメタル化および透析手順を用いる十分な Cu 結合は、達成されていないかもしれない。従って、ペプチド 1 サブユニットあたり、等量の Cu に結合する場合、メタル化した $\text{A}\beta_{1-40}$ の k_{cat} は、 $\text{A}\beta_{1-42}$ の k_{cat} に近づき得ることが可能である。 $\text{A}\beta_{1-40}$ 活性および $\text{A}\beta_{1-42}$ 活性の Cu 依存性飽和分析には、合成ペプチドのメタル化を最適化する手順、または生物学的供給源由来のミリグラム量のネイティブペプチドを変成せずに精製することを可能にする手順の開発が必要である。

【0175】

遊離の Cu(I) は、 $\text{pH } 7.4$ においてスーパーオキシドの不均化を触媒

するので ($k_{\text{cat}} = 1 \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$) (Cabelli, D. E., et al., J. Am. Chem. Soc. 109 (12) : 3665-3669 (1987))、ペプチドを過剰の $\text{Cu}(\text{II})$ を用いて調製することによって、少量の $\text{Cu}(\text{II})$ がこの研究において混入していた可能性があり得るか否かについて考慮された。 Cu 処理したペプチド溶液の徹底的な透析によって全ての遊離の $\text{Cu}(\text{II})$ を除去する試みにも関わらず、緩衝液自体の中の遊離の混入する Cu は、60 nm であることが見出された。観察されたジスムターゼ触媒が、遊離の混入する $\text{Cu}(\text{II})$ の産物であるか否かを決定するために、アルギニン存在下 ($40 \mu\text{M}$) での $\text{CuZn-A}\beta_{1-42}$ ($5 \mu\text{M}$) の活性を測定し、そしてアルギニンの存在が k_{obs} を減少しないことを見出した。アルギニンは、 $\text{Cu}(\text{II})$ をキレートする ($\log K_{\text{app}} = 5.9$) が、マイクロモル濃度で $\text{A}\beta_{1-42}$ から $\text{Cu}(\text{II})$ を取り除くには十分な親和性を有さない (Atwood, et al., 提出)。遊離の $\text{Cu}(\text{II})$ は、 $\text{pH} 7.4$ で、 $\text{Arg-Cu}(\text{II})$ ($2 \times 10^8 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$) よりも高い k_{cat} ($1 \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$) で、スーパーオキシドの不均化を触媒する (Cabelli, D. E., et al., J. Am. Chem. Soc. 109 (12) : 3665-3669 (1987))。従って、遊離の混入する $\text{Cu}(\text{II})$ が $\text{CuZn-A}\beta_{1-42}$ 調製物の見かけの触媒活性の原因である場合、アルギニンは、不均化の見かけの速度を減少する。

【0176】

$\text{Cu-A}\beta$ について観察された SOD 様活性が、ペプチド Cu 錯体に起因するが、遊離の混入する $\text{Cu}(\text{II})$ に起因しないことの第2の証拠は、(明らかに結合した) $\text{Cu}(\text{II})$ 濃度の結果として、 k_{cat} が指数関数的に上昇するということである (図15C)。このことは、観察された Cu 依存性活性が、ペプチドとの相互作用によって促進され、そしてただ単に総 Cu 濃度の結果ではないことを意味する。もしも、観察された SOD 活性が、ただ単に、ペプチド調製によってもたらされた微量の $\text{Cu}(\text{II})$ 混入に起因するならば、 k_{cat} 値は、漸増する総 Cu 濃度に関わらず $1 \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ (Cabelli, D. E., et al., J. Am. Chem. Soc. 109 (12) : 3665-3669 (1987)) で一定であろう (図15C)。

【0177】

Cu-A β について観察されたSOD様活性が、ペプチド-Cu錯体に起因したが、遊離の混入したCu(II)に起因するものではないことを示す第3の証拠は、結合していない金属を透析によって徹底的に除去する前に、Zn(II)を用いるペプチド-Cu錯体の処理によってその活性が顕著に増加したということであった(図15Aおよび図15B、表1)。調製における金属添加相の間の、Zn(II)を用いる競合は、存在する場合には、ペプチドに対するCu(II)結合を減少することが予測されるので、Zn(II)での前処理が活性を増加するという観察は、透析後に分析されたサンプル中の増加した遊離のCu(II)の存在によっては、説明されないようである。

【0178】

【表1】

	$k_{cat} (M^{-1} \text{秒}^{-1})$	Cu:A β 比	Zn:A β 比
A β 40またはZn-A β 40	0.0	0.0	0.0
A β 42またはZn-A β 42	0.0	0.0	0.0
Cu-A β 40	0.64×10^6	0.3	0.0
CuZn-A β 40	2.90×10^6	0.4	0.0
Cu-A β 42	2.24×10^7	0.7	0.0
CuZn-A β 42	2.11×10^8	1.4	0.0
SOD1	2×10^9	2	2

(表1) A β 金属錯体によって触媒されるH₂O₂/O₂⁻の不均化の速度定数(k_{cat})。ジスムターゼ活性が、A β 濃度が増加するにつれて減少したので(図15Aおよび図15B)、 k_{cat} を試験したペプチド濃度の最も低い濃度での曲線の傾きとして計算した(k_{obs} 対ペプチド濃度)。代表的なペプチドサンプルを、金属含量について測定した。同一条件下で得られたSOD1の k_{cat} を、比較のために示す。

【0179】

これらの観察は、メタル化したA β が、有意なSOD様活性を有することを示

す。このデータは、ペプチドのマイクロモル濃度 ($1 \sim 20 \mu\text{M}$) において得られたが、メタル化された $A\beta$ の k_{cat} ($\text{M}^{-1}\text{秒}^{-1}$ の SOD 活性単位) は、より低濃度で減少するとは予測されなかった。それにもかかわらず、近年の観察では、AD に罹患する脳における $A\beta$ の総濃度を約 $10 \mu\text{M}$ (そのうち約 200 nM が可溶性である) であるとして測定し (Cherny, R. A., et al., *Journal of Biological Chemistry*, 印刷中 (1999))、そしてタンパク質結合血漿 $A\beta_{1-42}$ レベルが、マイクロモル濃度であった (Kuo, Y. M., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257 (3) : 787-91 (1999))。従って、これらの観察は、 $A\beta$ のプールが、もしもこれらがメタル化される場合、インビボにおける有意な SOD 様活性に寄与し得ることを示唆する。

【0180】

SOD1 の活性は、最初に赤血球から精製され (McCord, J. M., および Fridovich, I., *J. Biol. Chem.* 244 (22) : 6049-55 (1969))、従って、市販の SOD1 調製物のように、そのタンパク質に結合する Cu および Zn の天然の割合を有した。 $A\beta$ が斑沈着において Cu および Zn とともに沈殿すること (Lovell, M. A., et al., *J. Neurol. Sci.* 158 (1) : 47-52 (1998))、および Cu 選択的キレート剤および Zn 選択的キレート剤が死後の AD 脳標本から $A\beta$ 凝集体を溶解する能力を有すること (Cherny, R. A., et al., *Journal of Biological Chemistry*, 印刷中 (1999)) から、AD において脳の $A\beta$ が Cu および Zn でメタル化されている可能性を示唆するが、 $A\beta$ が、インビボにおいて金属結合タンパク質であるのか否かは、未知である。細胞内には、遊離の Cu のプールは存在せず (Rae, T. D., et al., *Science* 284 (5415) : 805-8 (1999))、このことは、 $A\beta$ が放出される前に活性を持つのであれば、SOD についての CCS 機構のような添加機構によって、 $A\beta$ は、おそらく小胞体内において Cu でメタル化される必要があることを意味する。しかし、細胞外 Cu のプールについては、ほとんど未知である。Cu (約 $15 \mu\text{M}$) は、シナプ

ス伝達の際に放出され (Hartter, D. E., および Barnea, A., J. Biol. Chem. 263:799-805 (1998)), そして例えばADに罹患する脳において予測されるようなアシドーシス状態は、Cu (II) のA β への結合を促進する (Atwood, C. S., et al., Journal of Biological Chemistry 273:12817-12826 (1998))。この背景を考慮して、現在のインビトロでの観察は、少なくともADにおけるA β のインビボでのSOD様活性を高度に反映するようである。

【0181】

徹底的な透析がペプチドから結合したCu (II) 取り除くことができなかったため、このデータはまた、Cu (II) に対するA β の親和性が、顕著に高いことを確認する。さらに、Zn (II) に対するA β ₁₋₄₀およびA β ₁₋₄₂の親和性が、2つの部位において同一であること ($K_d=100$ nMおよび13 μ M) (Bush, A. I., et al., J. Biol. Chem. 269:12152-12158 (1994); Atwood et al., 未公開の観察)、高親和性部位におけるCu (II) に対するA β の親和性がZn (II) に対する親和性より高いこと、およびCu (II) に対するA β ₁₋₄₂の親和性が、Cu (II) に対するA β ₁₋₄₀の親和性よりもかなり高いこと (Atwood, C. S., et al., Journal of Biological Chemistry 273:12817-12826 (1998)) が近年見出された。A β ₁₋₄₀およびA β ₁₋₄₂に対するZn (II) の親和性は、徹底的な透析によってZn (II) が除去されることを妨げるのに十分なほどには明らかに高くないにもかかわらず、同一のインキュベーション条件下においてA β ₁₋₄₀に対するよりもA β ₁₋₄₂調製物に対して顕著により多くのCu (II) が結合したので、測定された親和性は、現在の知見と一致する (表1)。Zn (II) と同時にインキュベートすることは、Cu (II) の結合を促進するか (協調的に)、またはZn (II) が解離した後も安定であり続けるジスムターゼ活性を促進するペプチドの構造的コンフィギュレーションを永久的に適切な状態にするかのいずれかであり得る。Zn (II) がCu (II) 結合を促進し、そしてA β ₁₋₄₂

の活性を $A\beta_{1-40}$ よりも促進することを可能にする高次構造の要因は、未だ明らかでない。 $A\beta$ に対する $Zn(II)$ の結合がペプチドの α ヘリックス構造を促進するようであることが、以前に報告されている(Huang, X., et al., J. Biol. Chem. 272:26464-26470 (1997))。このことは、この構造的特徴が、 $Cu(II)$ 結合および活性を媒介し得ることを示唆する。

【0182】

ここで、本発明を十分に記載してきたが、当業者は、操作の広範に等価な様式内において、ならびに／あるいは、本発明または本発明の実施形態の範囲に影響を与えない他のパラメーターを使用して、本発明を実施し得ることを理解する。

【0183】

本明細書において引用された全ての特許および刊行物は、本明細書においてその全体が参考として援用される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、反応混合物の遠心分離後に残る可溶性 $A\beta_{1-40}$ の比率を示すグラフである。

【図2A】

図2Aは、金属イオン誘導性 $A\beta_{1-40}$ 凝集に対するpHの効果の濁度分析を示すグラフである。

【図2B】

図2Bは、種々の金属イオンとのインキュベーション後の上清中に残る可溶性 $A\beta_{1-40}$ の比率を示すグラフである。

【図2C】

図2Cは、種々の金属イオンとのインキュベーション後の上清中に残る可溶性 $A\beta_{1-40}$ の比率を示すグラフであり、ここで、高い金属イオン濃度が使用された。

【図3】

図3は、 $Cu(II)$ への $A\beta_{1-40}$ 結合の競合分析を示すグラフである。

【図 4 A】

図 4 A は、 $\text{PBS} \pm \text{Zn} (\text{II})$ において種々の pH でのインキュベーション後に上清に残る可溶性 $\text{A}\beta_{1\sim 40}$ の比率を示すグラフである。

【図 4 B】

図 4 B は、異なる $\text{Cu} (\text{II})$ 濃度との種々の pH でのインキュベーション後の上清に残る可溶性 $\text{A}\beta_{1\sim 40}$ の比率を示すグラフである。

【図 4 C】

図 4 C は、異なる $\text{Cu} (\text{II})$ 濃度との pH 7.4 および 6.6 での $\text{A}\beta_{1\sim 40}$ の nm 濃度の相対凝集を示すグラフである。

【図 5 A】

図 5 A は、キレーター連続サイクルにより逆転した pH 7.4 での $\text{Cu} (\text{I})$ 誘導性 $\text{A}\beta_{1\sim 40}$ 凝集の濁度分析を示すグラフである。

【図 5 B】

図 5 B は、7.4 と 6.6 との間を pH が循環する場合の、 $\text{Cu} (\text{I})$ 誘導性 $\text{A}\beta_{1\sim 40}$ 凝集の可逆性の濁度分析を示すグラフである。

【図 6】

図 6 は、 $\text{A}\beta_{1\sim 42}$ 付近の APP_{669~716} のアミノ酸配列 (配列番号 1) を示す。ラット $\text{A}\beta$ は、変異されている (R5G、Y10F、H13R; 太字)。可能な金属結合残基に下線が付されている。

【図 7】

図 7 は、 $\text{A}\beta$ 形成に対する pH、 $\text{Zn} (\text{II})$ および $\text{Cu} (\text{II})$ の効果を示すグラフである。

【図 8】

図 8 は、死後の脳組織からの $\text{A}\beta$ の抽出を示す、ウェスタンブロットである。

【図 9】

図 9 は、銅による $\text{A}\beta$ 架橋を示すウェスタンブロットである

【図 10】

図 10 は、 $\text{A}\beta$ による $\text{Cu} (\text{I})$ 生成を示すグラフである。

【図 11】

図 1 1 は、 $A\beta$ による H_2O_2 生成を示すグラフである。

【図 1 2】

図 1 2 は、インビトロでの種々の $A\beta$ ポリペプチドの抗スーパーオキシド活性を示す棒グラフである。

【図 1 3 A】

図 1 3 A は、C100 トランスジェニックマウス由来の線維芽細胞の生存度に対するスーパーオキシド生成の効果をj示すグラフである。図 1 3 A は、Tg C100、V717F マウスから培養された初代線維芽細胞（白丸）が、漸増濃度のキサンチンオキシダーゼに Tg C100、WT マウス線維芽細胞（黒丸）よりも抵抗性であったことを示す（スチューデント t 検定、 $P < 0.01$ ）。

【図 1 3 B】

図 1 3 B は、C100 トランスジェニックマウス由来の線維芽細胞の生存度に対するスーパーオキシド生成の効果を示すグラフである。図 1 3 B は、ナノモル濃度の合成 $A\beta_{1\sim42}$ が、スーパーオキシド損傷に対する Tg C100、WT 線維芽細胞の抵抗性を増加させたことを示す（スチューデント t 検定、 $P < 0.01$ ）。この効果は、 $50 U/ml$ SOD1 での処理に匹敵した（スチューデント t 検定、 $P < 0.05$ ）。

【図 1 4 A】

図 1 4 A は、CuZn- $A\beta_{1\sim42}$ の存在下でのパルス放射線分解により生成されたスーパーオキシドの減衰の分光測定記録の例である。図 1 4 A は、主な $A\beta$ 種によるスーパーオキシド不均化の触媒について一次速度論を示す。

【図 1 4 B】

図 1 4 B は、Zn- $A\beta_{1\sim42}$ の存在下でのパルス放射線分解により生成されたスーパーオキシドの減衰の分光測定記録の例である。図 1 4 B は、主な $A\beta$ 種によるスーパーオキシド不均化の触媒について二次速度論を示す（x 軸上の異なる時間間隔に注意のこと）。

【図 1 5 A】

図 1 5 A は、同時不均化から予測される減衰を超える O_2^- (k_{obs}) の減衰において観察された増加を示すグラフである。図 1 5 A は、スーパーオキシド減衰

の速度 (k_{obs}) に対する $\text{Cu A } \beta_1 \sim 40$ および $\text{Cu Z n A } \beta_1 \sim 40$ の効果を示す。

【図 1 5 B】

図 1 5 B は、同時不均化から予測される減衰を超える O_2^- (k_{obs}) の減衰において観察された増加を示すグラフである。図 1 5 B は、スーパーオキシド減衰の速度 (k_{obs}) に対する $\text{Cu A } \beta_1 \sim 42$ および $\text{Cu Z n A } \beta_1 \sim 42$ の効果を示す。

【図 1 5 C】

図 1 5 C は、同時不均化から予測される減衰を超える O_2^- (k_{obs}) の減衰において観察された増加を示すグラフである。図 1 5 C は、 $\text{A } \beta_1 \sim 40$ (白四角) または $\text{A } \beta_1 \sim 42$ (黒四角) に結合した対応する Cu 当量に対してプロットしたジスムターゼ活性 (k_{cat}) 値を示す。これは、この k_{cat} が、ペプチド媒介性因子に依存すること、そして結合した Cu 当量に単に比例するわけではないことを示す。値は、表 1 から得られる。実施例 3 を参照のこと。

【図1】

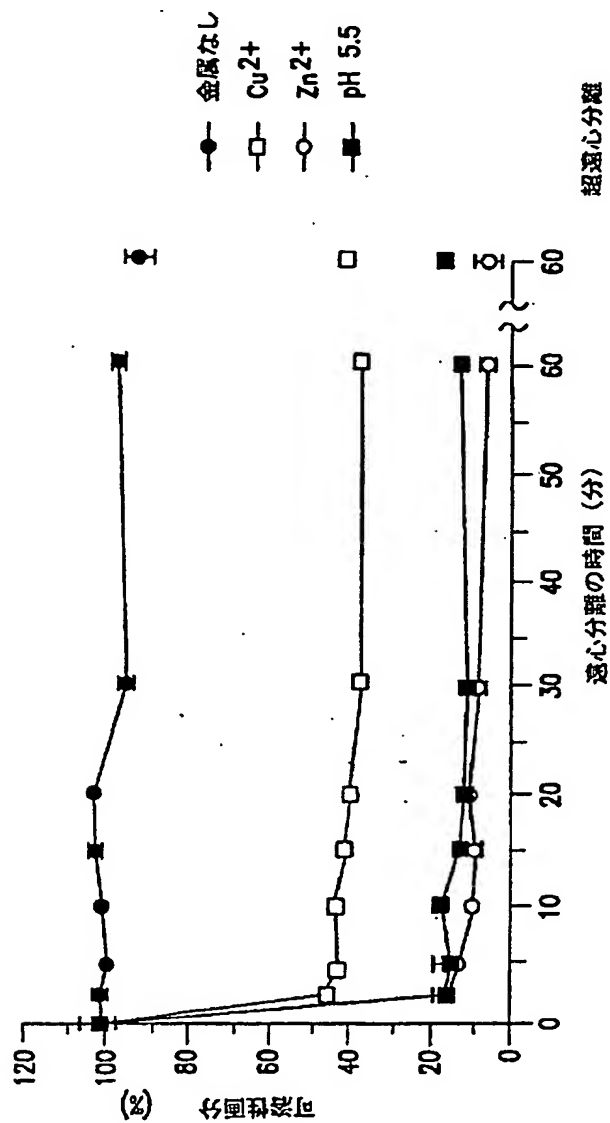
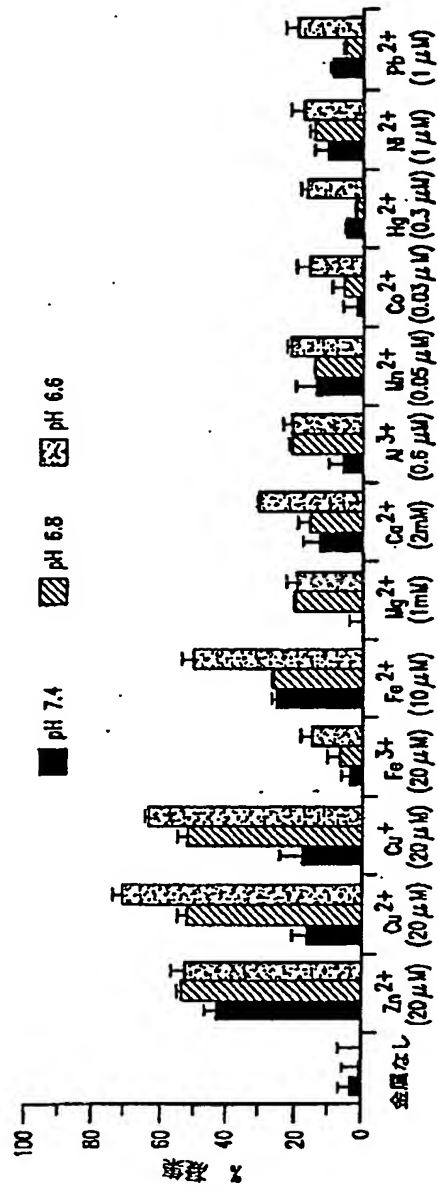


FIG.1

【図 2 A】



金属イオン

FIG.2A

【図2B】

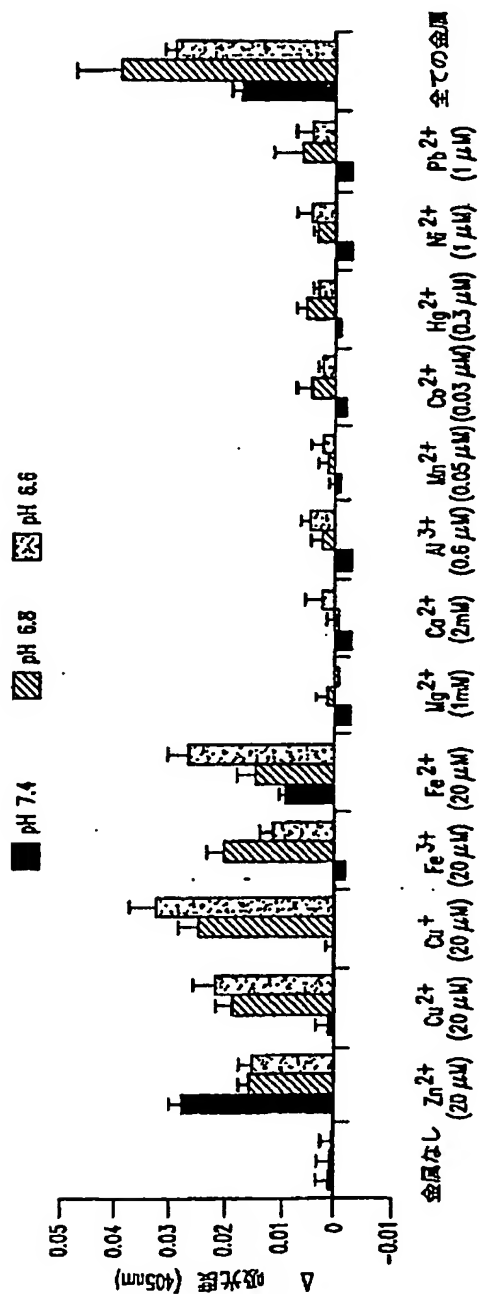


FIG.2B

【図 2 C】

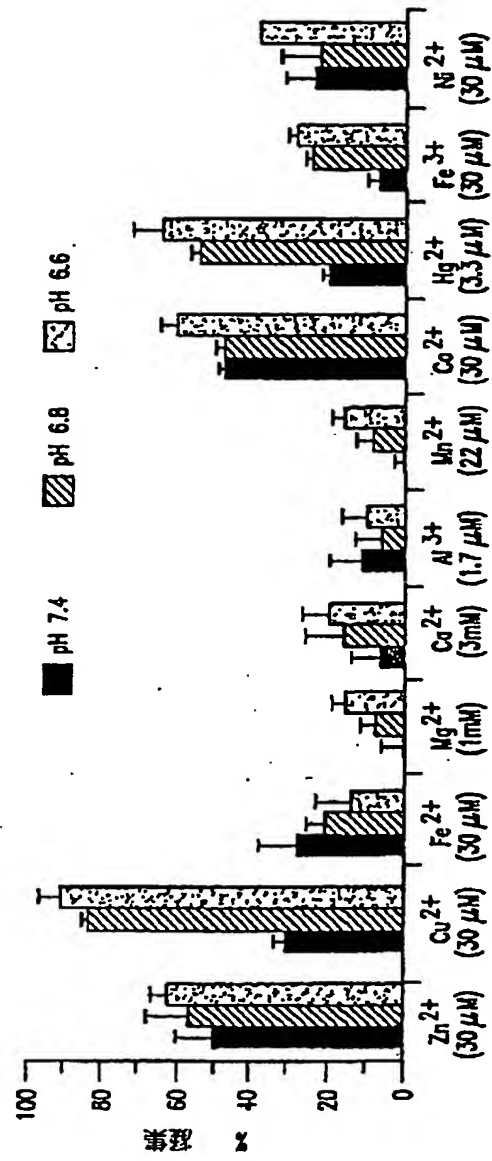


FIG.2C

【图 3】

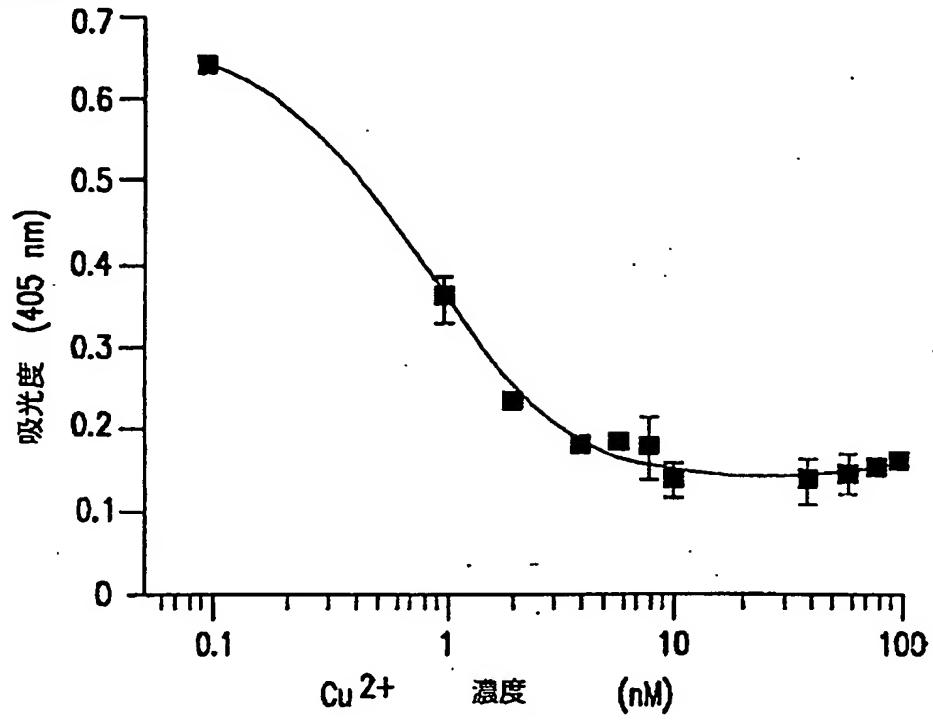


FIG.3

【図 4 A】

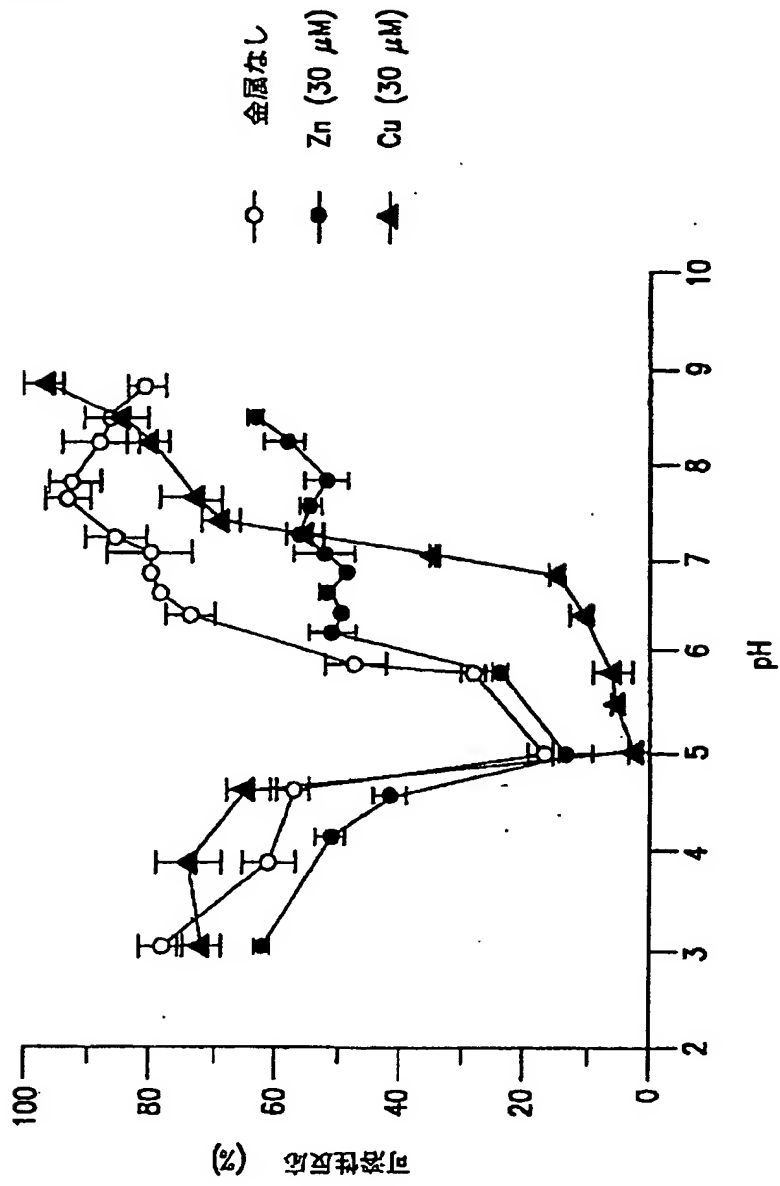


FIG.4A

【図 4 B】

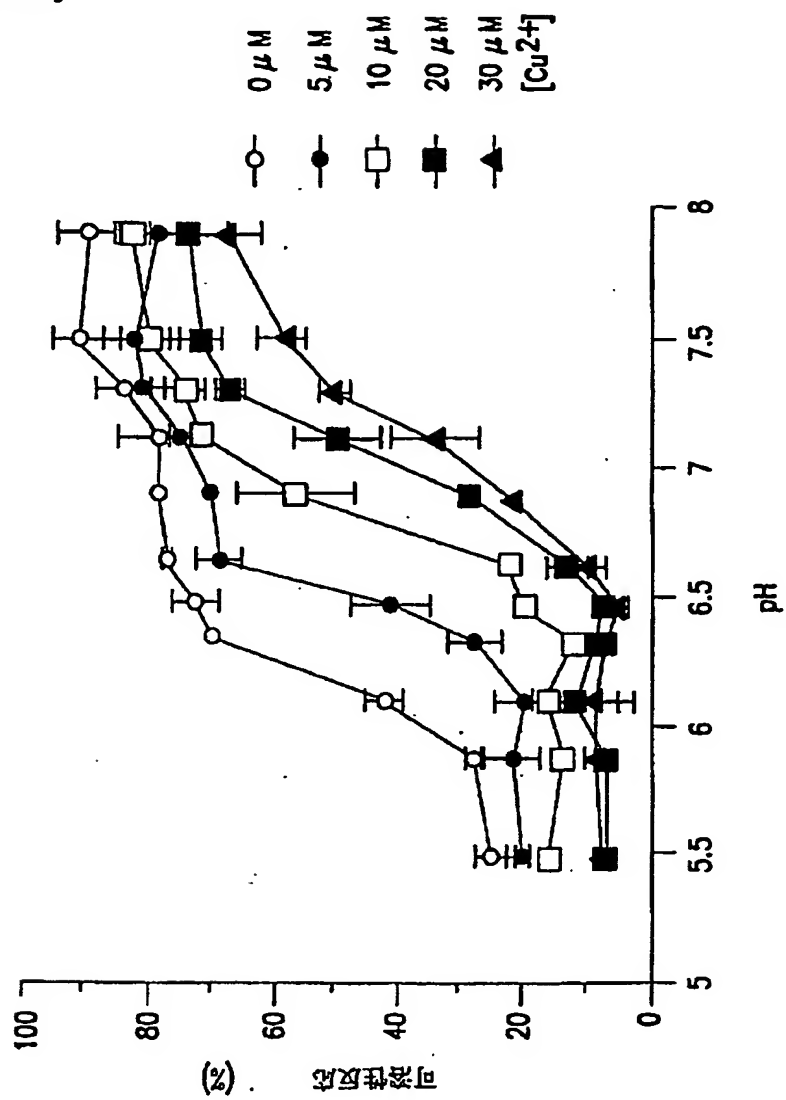


FIG.4B

【図 4 C】

相対シグナル

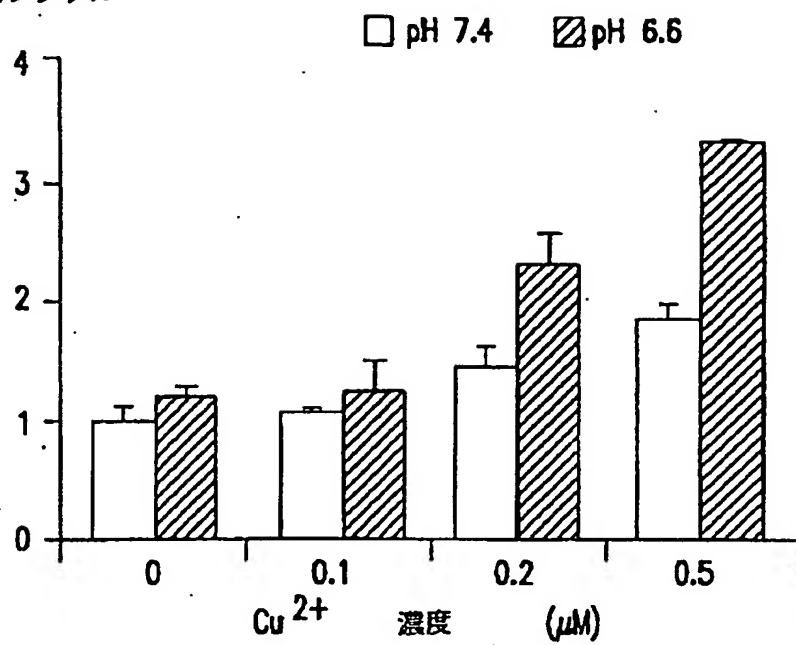


FIG.4C

【図5 A】

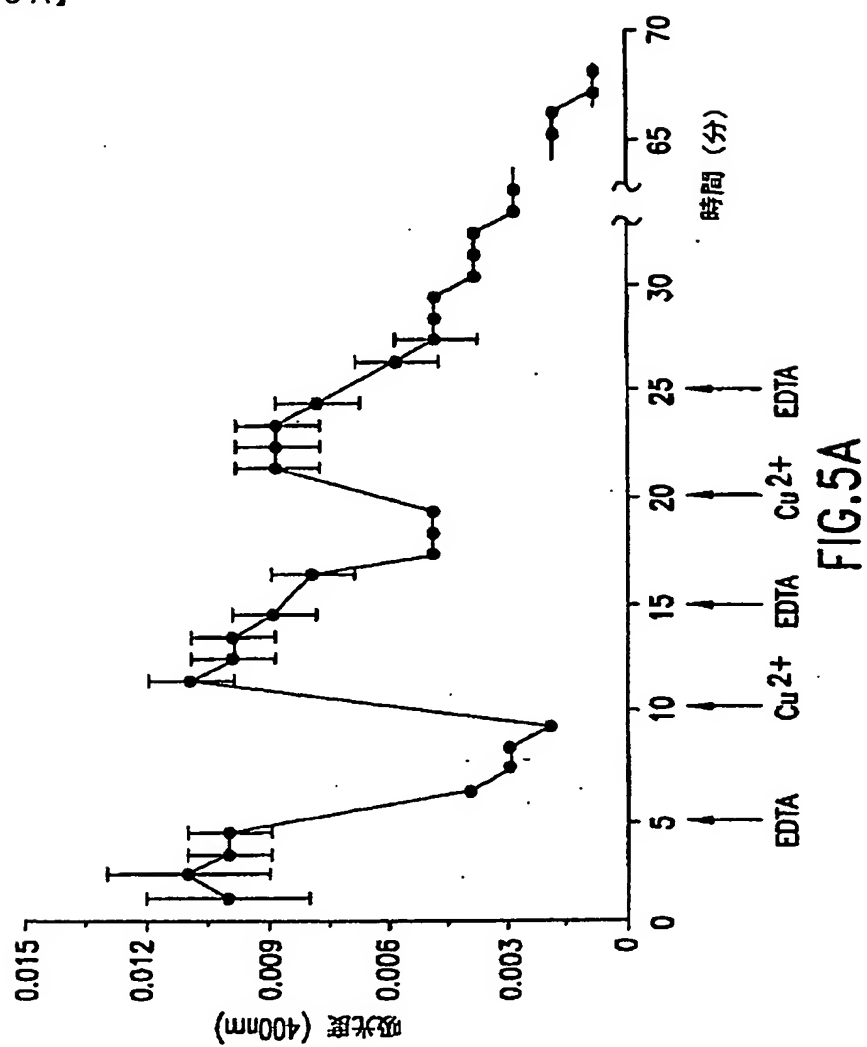


FIG.5A

【図5B】

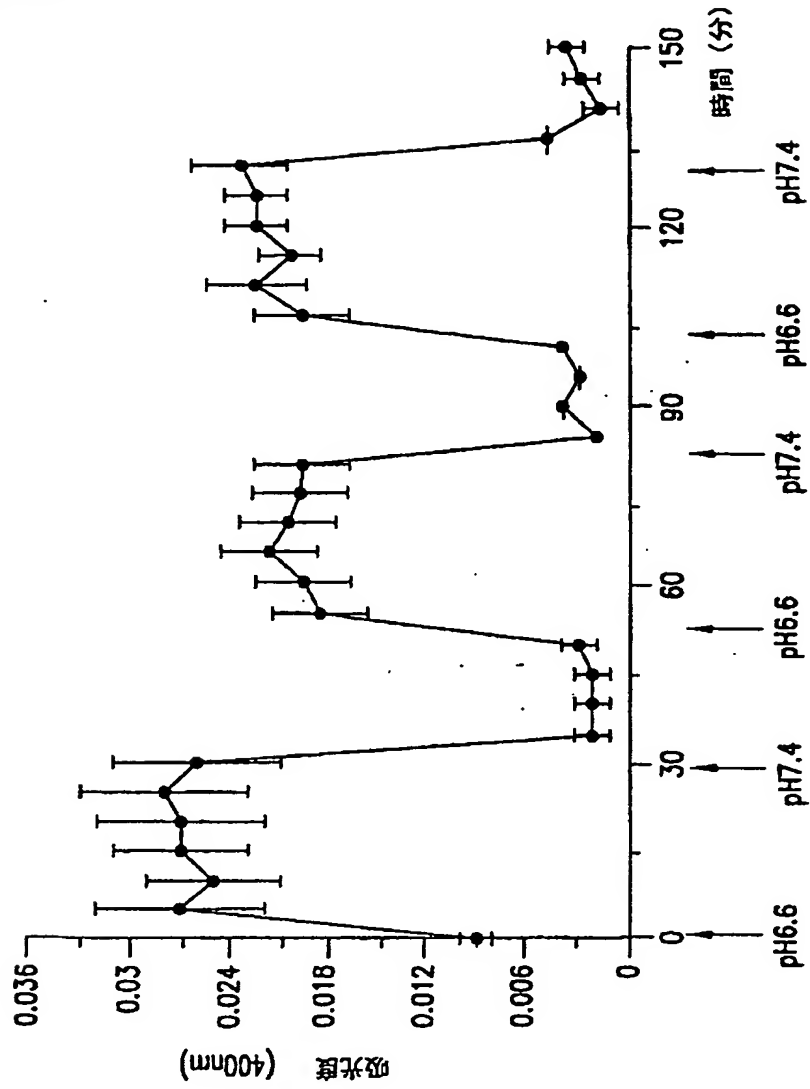


FIG.5B

【図6】

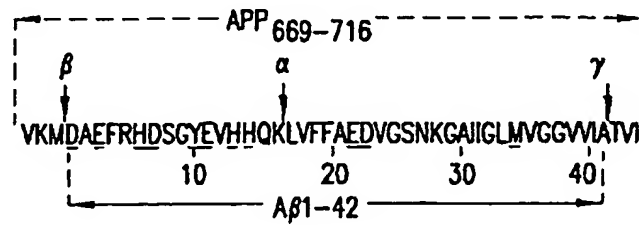


FIG.6

【図7】

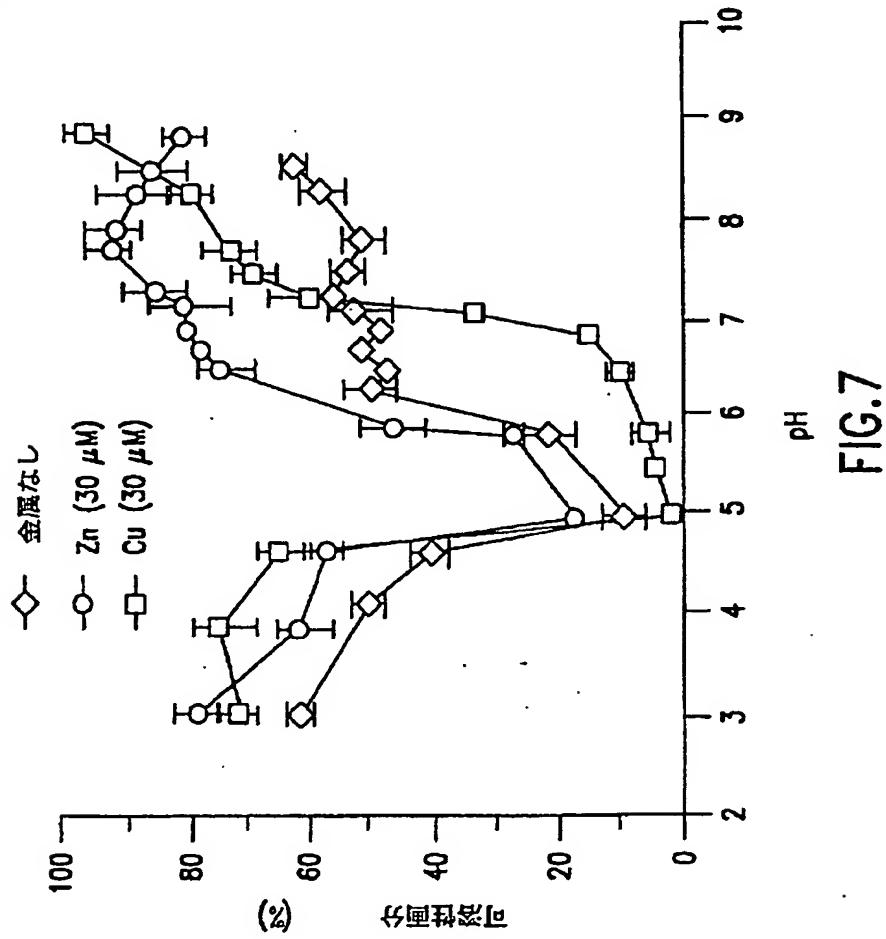


FIG.7

【図8】

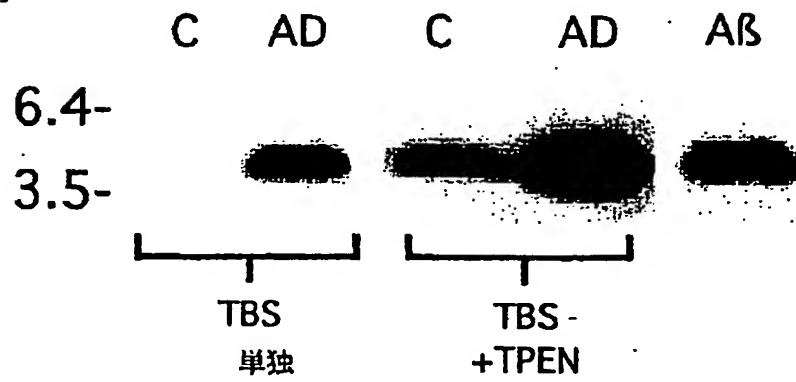


FIG.8

【図9】

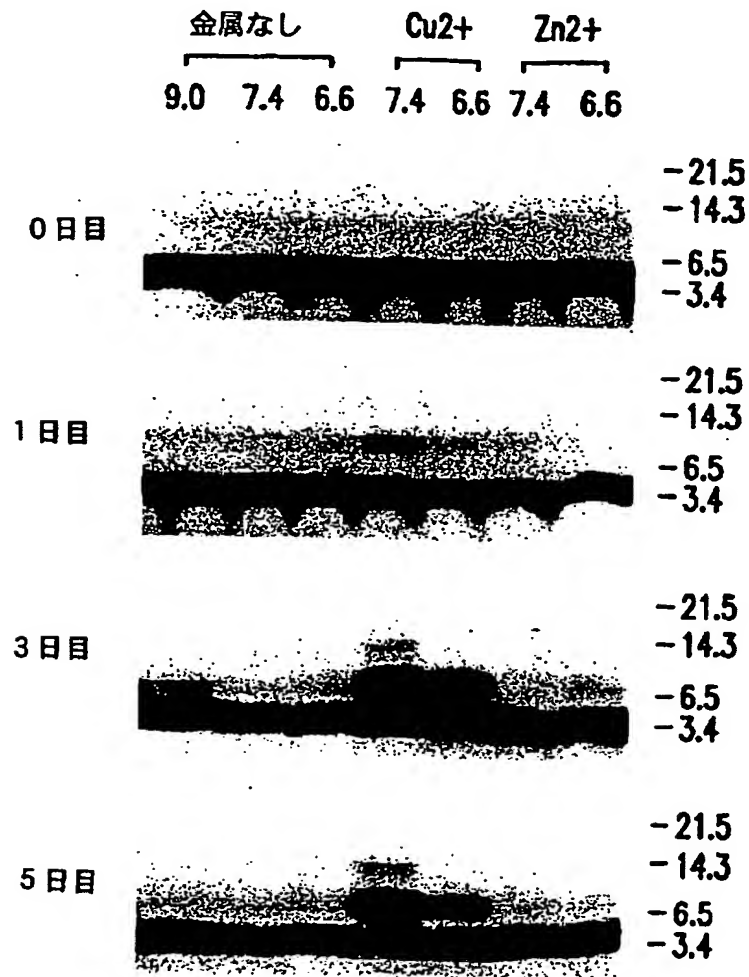


FIG.9

【図 10】

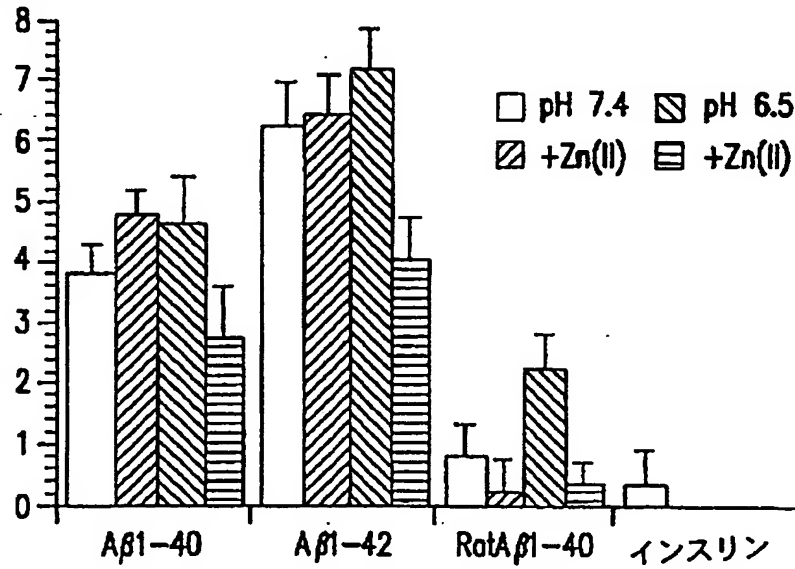
Cu(I) (μ M)

FIG.10

【図 11】

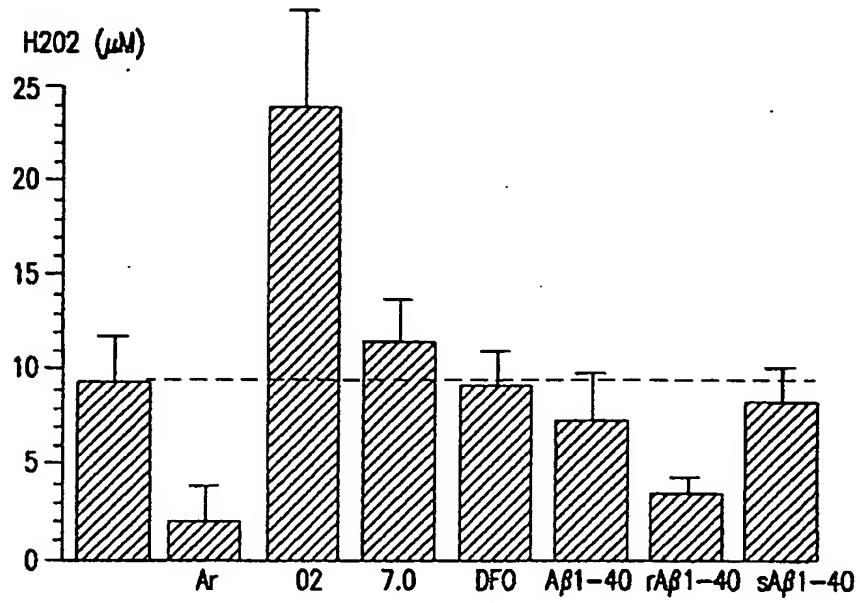


FIG.11

【図 12】

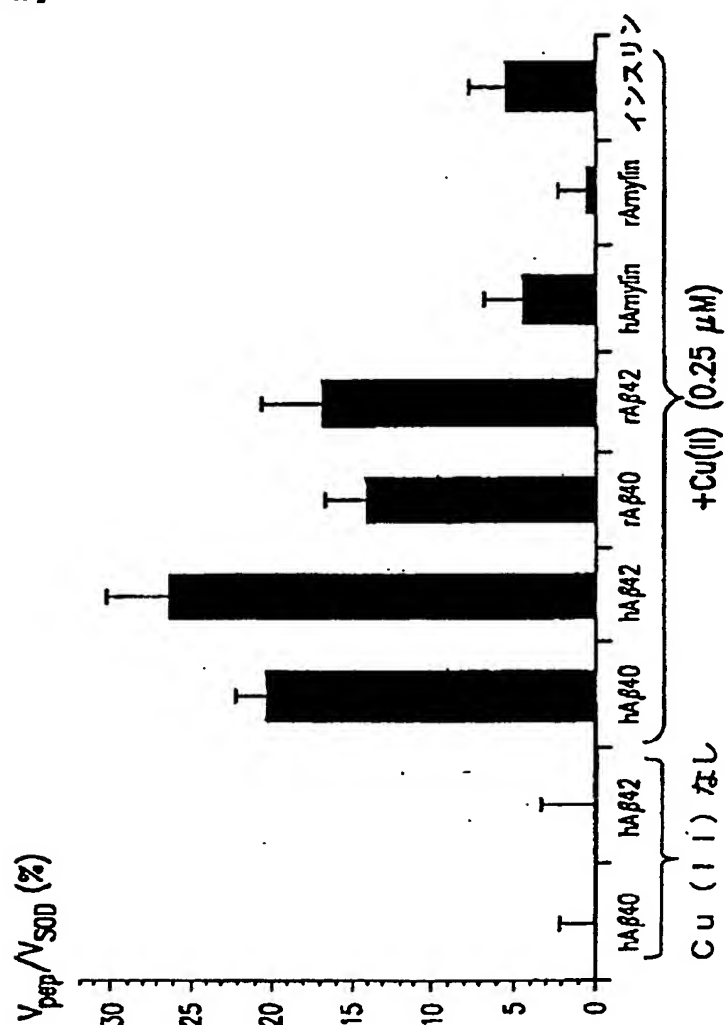


FIG.12

【図13A】

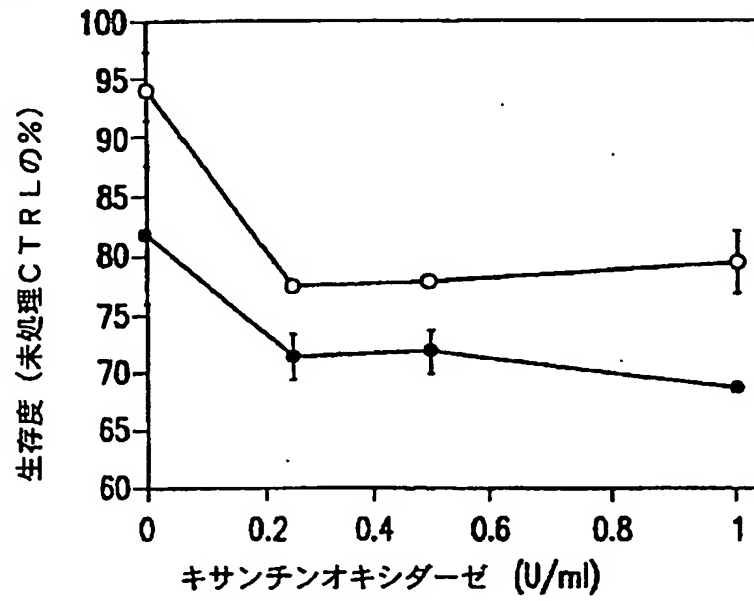


FIG.13A

【図13B】

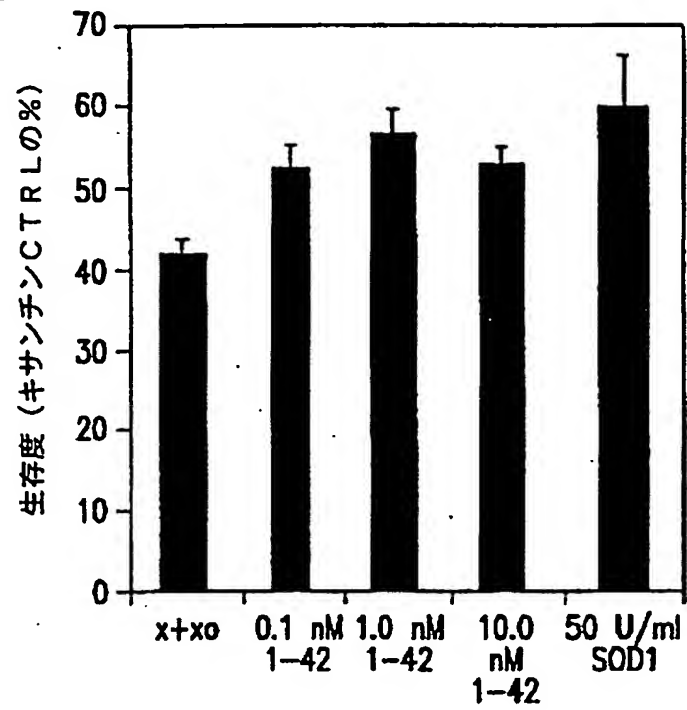


FIG.13B

【図 14 A】

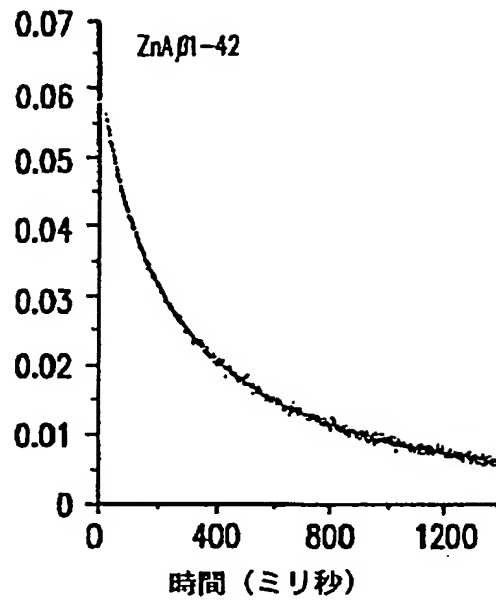


FIG.14A

【図 14 B】

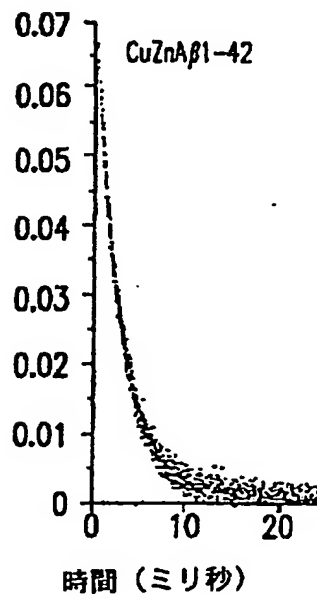


FIG.14B

【図15A】

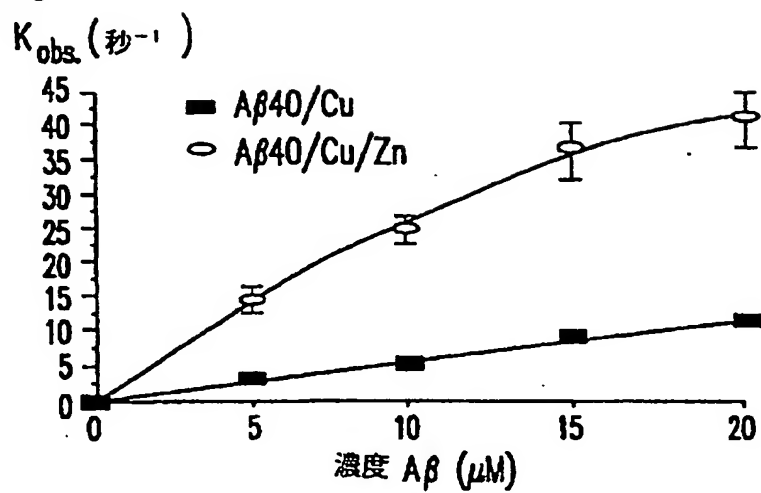


FIG.15A

【図15B】

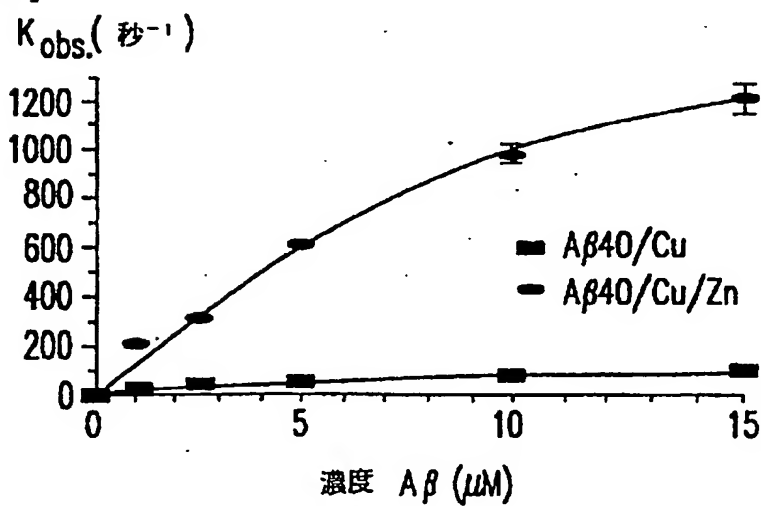


FIG.15B

【図 15 C】

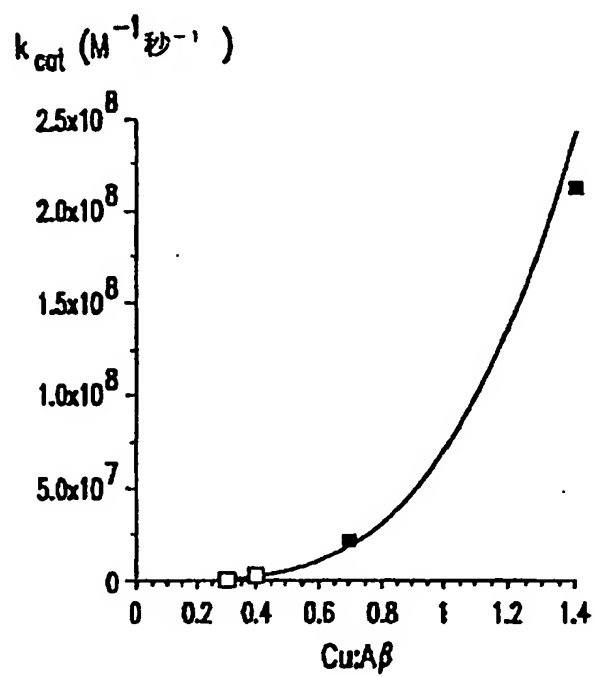


FIG.15C

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/11715

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 49/00; C12Q 1/26, 1/28 US CL : 424/9.1, 9.2; 435/25, 28 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/9.1, 9.2; 435/25, 28 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST, CHERM ABSTRACTS, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevance to claim No.
A	WO 99/18432 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 15 April 1999(15.04.99).	1-38
A, P	HUANG et al. The AB Peptide of Alzheimer's Disease Directly Produces Hydrogen Peroxide Through Metal Ion Reduction. Biochemistry. 15 June 1999. Vol. 38, No. 24, pages 7609-7616.	1-38
Y	ATWOOD et al. Role of Free Radicals and Metal Ions in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. Metal Ions in Biological Systems. 07 April 1999. Volume 36, Chapter 10, pages 309-364, see entire document.	1-38
A	MCKEON-O'MALLEY et al. Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease. Emerging Therapeutic Targets. February 1998. Vol. 2, No. 2, pages 157-179.	1-38
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be distinguished to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "G" document in another of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 25 JULY 2000		Date of mailing of the international search report 30 AUG 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-5230		Authorized officer RALPH GITOMER Telephone No. (703) 308-1235

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/11715

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A, P	US 5,927,283 A (ABRAHAM et al.) 27 July 1999(27.07.99).	1-38
Y	WO 96/07096 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 07 March 1996(07.03.96), see entire document	1-38
A,&	WO 98/40071 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 17 September 1998(17.09.98).	1-38

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	キーワード (参考)
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 21/78	Z 4 B 0 6 3
31/00		31/00	M
			S
33/15		33/15	Z
33/566		33/566	

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, GM, K E, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, C N, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, K P, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, S G, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ホアン, シュドン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ
02140, ケンブリッジ, レンジ アベ
ニュー 402, アpartment 101

(72) 発明者 アトウッド, クレイグ エス,

アメリカ合衆国 オハイオ 44106, ク
リーブランド, アデルバート ロード
2085, ケース ウェスタン リザーブ
ユニバーシティ, ルーム 403, イン
スティテュート オブ パソロジー

(72) 発明者 タンジ, ルドルフ イー,

アメリカ合衆国 マサチューセッツ
02045, ハル, オーシャンサイド ド
ライブ 3

(108)

Fターム(参考) 2G042 AA01 BB11 BC08 BC10 CA02
CB03 DA06 FA04 FA05 FA06
FA07 FB02
2G045 AA28 BB20 CB01 CB13 CB26
DB11 DB13 DB21 GC10 GC22
2G054 AB03 CA07 CA10 CE01 CE08
EA04 EB01 GA03 GB01
2G057 AA01 AB01 AB03 AB06 AC01
BA01 BA03 GA03
2G059 AA05 AA06 BB12 CC16 DD04
EE01 EE11 EE12 FF04 HH02
HH03 MM01
4B063 QA20 QQ22 QR50 QR66 QS02
QX02

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.